

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA 1-ALIL-3-(3-KLOROBENZOIL)TIOUREA TERHADAP ISOLAT URIN *Escherichia coli***  
**KODE 1223**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



**Oleh:**

**Veren Kurnia Putri  
NIM 175070507111012**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2021**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA 1-ALIL-3-(3-KLOROBENZOIL)TIOUREA TERHADAP ISOLAT URIN *Escherichia coli* KODE 1223**

Oleh :

**Veren Kurnia Putri**

**NIM 175070507111012**

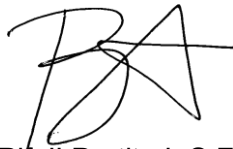
Telah diuji pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 27 Mei 2021

dan dinyatakan lulus oleh :

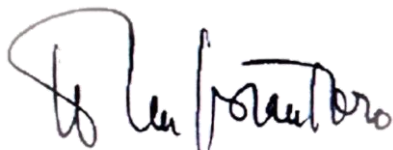
Penguji-I,



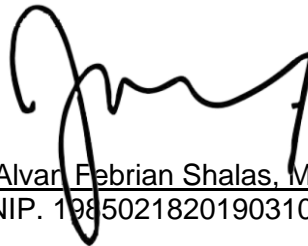
apt. Bachtiar Rifa'i Pratita I, S.Farm., M.Farm.  
NIP. 198709292019031007

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,



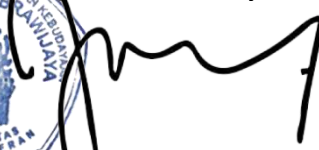
Prof. Dr. apt. Dra. Sri Winarsih, M.Si.  
NIP. 195408231981032001



apt. Alvar Febrian Shalas, M.Farm.  
NIP. 198502182019031007

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,



apt. Alvar Febrian Shalas, M.Farm.  
NIP. 198502182019031007

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Veren Kurnia Putri

NIM : 175070507111012

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi  
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan



Veren Kurnia Putri  
(175070507111012)

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat, rahmat, dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir dengan judul “Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea Terhadap Isolat Urin *Escherichia coli* Kode 1223”.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof. Dr. Dra. apt. Sri Winarsih, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah bersedia memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta saran yang membangun agar terselesaikannya Tugas Akhir ini dengan baik.
2. apt. Alvan Febrian Shalas, M.Farm. selaku dosen pembimbing II yang telah bersedia membantu dalam membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyusun Naskah Tugas Akhir ini.
3. apt. Bachtiar Rifa'i Pratita Ihsan, S.Farm., M.Farm. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran yang membangun untuk menyempurnakan Naskah Tugas Akhir ini.
4. apt. Oktavia Eka Puspita, M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasihat selama menuntut ilmu di Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. apt. Hananditia Rachma P, S.Farm., M.Farm.Klin. selaku ketua tim Tugas Akhir Program Studi Sarjana Farmasi yang telah memberikan arahan dan motivasi agar Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan cepat.
6. Seluruh dosen dan civitas akademika Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan ilmu

dan pengalaman yang berharga selama menuntut ilmu hingga melaksanakan Tugas Akhir.

7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB
8. Segenap Analis dan Petugas Laboratorium Farmasi FKUB dan Laboratorium Mikrobiologi yang telah memberikan bantuan selama melakukan penelitian.
9. Kedua orang tua saya, Bapak W. Krishna Adji dan Ibu Hana Hasiana yang telah memberikan dukungan moral, doa, dan kasih sayangnya serta dukungan *financial* sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini tepat pada waktunya.
10. Kakak laki-laki saya, Muhammad Saifulhakim yang telah memberikan semangat, kritik, saran, dan doa untuk keberhasilan Tugas Akhir penulis.
11. Noor Feliati dan Natasya Dhea S sebagai sahabat yang telah menemani dan membantu saya dalam masa-masa sulit.
12. Firda Khoirunnisa, Adelia Ayu P, Tiara Rahma A, Kevin Diagona, dan Rima Nuraini sebagai sahabat yang telah menemani saya dalam suka duka ketika menimba ilmu di Program Studi Sarjana Farmasi FKUB
13. Teman-teman Farmasi 2017 FKUB yang telah menjadi keluarga dalam menimba ilmu dan bersenda gurau.
14. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Malang, Mei 2020

Penulis

## ABSTRAK

Putri, Veren Kurnia. 2021. *Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea Terhadap Isolat Escherichia coli 1223*. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. Dra. Apt. Sri Winarsih, M.Si. (2) apt. Alvan Febrian Shalas, S.Farm., M.Farm.

Pengembangan obat dapat dilakukan dengan cara memodifikasi struktur suatu senyawa agar sifat fisikokimia yang dimiliki senyawa tersebut dapat berubah. Pada penelitian ini dilakukan sintesis dari senyawa turunan tiourea untuk mendapatkan senyawa baru, yakni 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang diharapkan memiliki efek sebagai antibakteri terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223. Sintesis 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea didapatkan melalui reaksi substitusi nukleofilik yang dimodifikasi dengan reaksi *Schotten-Baumann*. Struktur senyawa dari produk sintesis dianalisis menggunakan spektrofotometri UV, FTIR, NMR, dan spektroskopi Massa. Selanjutnya, senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea diuji aktivitas antibakterinya dengan metode dilusi agar untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) senyawa uji secara *in vitro*. Rendemen yang diperoleh dari sintesis 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea sebanyak 12,4617% dan uji konfirmasi struktur menunjukkan bahwa senyawa baru yang terbentuk merupakan senyawa yang diinginkan. Pada uji aktivitas antibakteri, digunakan gentamisin sebagai senyawa pembanding dengan 5 konsentrasi berbeda. Berdasarkan hasil pengujian pada senyawa gentamisin, diperoleh nilai KHM gentamisin pada penelitian ini sebesar 2 ppm. Sementara itu, senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang dibuat dalam 8 konsentrasi yang berbeda menunjukkan tidak adanya penghambatan pertumbuhan isolat bakteri *Escherichia coli* 1223 pada seluruh konsentrasi yang tersedia. *Scoring* pada senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak linier (acak). Oleh karena itu, dapat ditarik kesimpulan bahwa senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga tidak dapat dibandingkan dengan antibakteri gentamisin.

Kata Kunci: Sintesis, 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea, *Escherichia coli*, antibakteri, *Schotten-Baumann*

## ABSTRACT

Putri, Veren Kurnia. 2021. *Synthesis and Antibacterial Activity Test of 1-Allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea against Escherichia coli 1223 Isolate*. Final Assignment, Bachelor of Pharmacy; Faculty of Medicine; Brawijaya University Malang. Supervisors: (1) Prof. Dr. Dra. Apt. Sri Winarsih, M.Si. (2) apt. Alvan Febrian Shalas, S.Farm., M.Farm.

The development of medicine can be done by modifying structure of a compound in order that the psycho-chemical properties of the compound can change. In this research, a synthesis from thiourea derivative compound was conducted to obtain a new compound namely 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)thiourea which is expected that it has an effect as antibacterial against urine isolate of *Escherichia coli* 1223. The synthesis of 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl) thiourea was obtained from nucleophilic substitution reaction which was modified by *Schotten-Baumann* reaction. The compound structure from the synthesis product was analyzed by using UV spectrophotometry, FTIR, NMR and mass spectroscopy. Afterwards, the antibacterial activity of the compound 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)thiourea was tested by using dilution method in order to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the testing compound using in vitro way. The yield obtained from the 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea synthesis was 12.4617% and the structural confirmation test revealed that the new compound formed was the expected compound. In the antibacterial activity test, gentamicin was used as a comparison compound with 5 different concentrations. Based on the results on the gentamicin compound test, the MIC value of the gentamicin in this research was 2 ppm. Meanwhile, the compound 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea test prepared in eight different concentrations did not show growth inhibition of *Escherichia coli* 1223 bacterial isolate in all available concentrations. The scoring on the compound 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea varied. Hence, it can be concluded that the compound 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea test did not have antibacterial activity, so it cannot be compared to the gentamicin antibacterial.

Keyword: Synthesis, 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea, *Escherichia coli*, antibacterial, *Schotten-Baumann*

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>JUDUL .....</b>	
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus .....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Akademik.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Infeksi Bakteri.....	8
2.2 Infeksi Saluran Kemih.....	9
2.2.1 Definisi .....	9
2.2.2 Patofisiologi.....	10
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.3.1 Pewarnaan Gram .....	12
2.3.2 Medium Pertumbuhan Bakteri <i>E. coli</i> .....	13



2.3.2.1	<i>MacConkey Agar</i> .....	15
2.3.1.2	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i> .....	15
2.4	Antibakteri .....	16
2.5	<i>Multidrug-Resistant E. coli</i> .....	18
2.6	Penemuan Senyawa .....	19
2.6.1	<i>Structure-Based Drug Design</i> .....	20
2.6.2	<i>Ligand-Based Drug Design</i> .....	21
2.6.2.1	<i>Pharmacophore</i> .....	21
2.6.2.2	Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Obat (HKSA).....	22
2.7	Tiourea .....	23
2.8	Benzoiltiourea .....	26
2.9	Sintesis Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea .....	27
2.10	Substitusi Nukleofilik .....	28
2.11	Uji Kemurnian.....	29
2.11.1	Kromatografi Lapis Tipis .....	29
2.11.2	Uji Melting point.....	30
2.12	Uji Konfirmasi Struktur Obat .....	31
2.12.1	Spektrofotometri UV-Vis .....	31
2.12.2	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)</i> .....	32
2.12.3	Spektrofotometri <sup>1</sup> H-NMR dan <sup>13</sup> C-NMR.....	33
2.12.4	Spektroskopi Massa.....	34
2.15	Uji Aktivitas Antibakteri secara <i>In Vitro</i> .....	35
2.15.1	Metode Dilusi .....	36
2.15.1.1	Metode Dilusi Cair ( <i>Broth Dilution</i> ).....	36
2.15.1.2	Metode Dilusi Agar .....	37
2.15.2	Metode Difusi.....	38
2.15.2.1	Difusi Cakram.....	38
2.15.2.2	Difusi Sumuran.....	39
2.15.2.3	<i>E-Test</i> .....	40
2.16	<i>Scoring (Semi-Quantitative)</i> .....	41
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>		<b>43</b>
3.1	Kerangka Konsep Penelitian .....	43

3.2 Hipotesis Penelitian .....	46
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>47</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	47
4.2 Subjek Penelitian.....	47
4.3 Jumlah Pengulangan.....	47
4.4 Variabel Penelitian .....	48
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	49
4.6 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian.....	49
4.6.1 Bahan.....	49
4.6.2 Alat.....	49
4.7 Definisi Istilah / Operasional .....	50
4.8 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data .....	51
4.8.1 Sintesis Senyawa .....	52
4.8.2 Uji Kemurnian.....	53
4.8.2.1 Uji KLT .....	53
4.8.2.2 Uji Rentang Titik Lebur.....	53
4.8.3 Uji Konfirmasi Struktur.....	54
4.8.3.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV .....	54
4.8.3.2 Uji Konfirmasi struktur dengan Spektrofotometer IR.....	54
4.8.3.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri NMR.....	55
4.8.3.4 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektroskopi Massa (ESI) .....	55
4.8.4 Uji Bakteri dengan Mengukur Kadar Hambat Minimum (Metode Dilusi Agar).....	56
4.8.4.1 Identifikasi Bakteri.....	56
4.8.4.1.1 Pewarnaan Gram .....	56
4.8.4.1.2 Kultur Isolat Bakteri pada Media <i>MacConkey Agar</i> .....	57
4.8.4.1.3 Kultur Isolat Bakteri pada Media <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> ..	57
4.8.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri.....	58
4.8.4.2.1 Preparasi Kultur Bakteri.....	58
4.8.4.2.2 Preparasi <i>Suspending Agent</i> Tween 80 0.4% .....	59
4.8.4.2.3 Preparasi Kontrol Bakteri (Larutan Tween-80 0,4%).....	59
4.8.4.2.4 Preparasi Senyawa Pembanding (Larutan Gentamisin) .....	60

4.8.4.2.5	Preparasi Suspensi Kontrol BATU-3.....	60
4.8.4.2.6	Preparasi Suspensi Uji BATU-3.....	61
4.8.4.2.7	Uji Aktivitas Antibakteri (Metode Dilusi Agar) .....	62
4.9	Analisis Data .....	63
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA .....</b>		<b>65</b>
5.1	Sintesis Senyawa BATU- 3 .....	65
5.1.1	Rendemen dan Organoleptis Kristal Senyawa BATU-3.....	66
5.1.2	Hasil Uji Kemurnian BATU-3 .....	67
5.1.2.1	Hasil Uji Kemurnian KLT .....	67
5.1.2.2	Hasil Uji Kemurnian Rentang Titik Lebur .....	68
5.1.3	Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-3.....	70
5.1.3.1	Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri UV .....	70
5.1.3.2	Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Inframerah (IR) .....	71
5.1.3.3	Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektrometri NMR.....	73
5.1.3.3.1	Hasil <sup>1</sup> H-NMR .....	73
5.1.3.3.2	Hasil <sup>13</sup> C-NMR .....	74
5.1.3.4	Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektroskopi Massa .....	76
5.2	Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea .....	79
5.2.1	Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	79
5.2.1.1	Uji Pewarnaan Gram.....	79
5.2.1.2	Kultur Pada Media MacConkey Agar (MAC) .....	80
5.2.1.3	Kultur Pada Media Eosin Methylene Blue (EMB) .....	81
5.2.2	Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi Agar .....	82
5.3	Analisis Data .....	89
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>		<b>91</b>
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian.....	91
6.2	Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian .....	104
6.3	Keterbatasan Penelitian .....	104
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>		<b>106</b>

7.1 Kesimpulan .....	106
7.2 Saran .....	106
DAFTAR PUSTAKA.....	108
LAMPIRAN .....	122

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Serbuk Senyawa Produk BATU-3 .....	66
Tabel 5.2 Persen Rendemen Kristal Senyawa Produk BATU-3 .....	66
Tabel 5.3 Hasil Jumlah Noda dan Nilai Rf Uji KLT .....	68
Tabel 5.4 Hasil Rentang Titik Lebur Senyawa BATU-3.....	69
Tabel 5.5 Interpretasi Hasil Spektra IR Senyawa BATU-3 .....	72
Tabel 5.6 Interpretasi Hasil Spektra $^1\text{H}$ -NMR Senyawa BATU-3.....	74
Tabel 5.7 Interpretasi Hasil Spektra $^{13}\text{C}$ -NMR Senyawa BATU-3.....	75
Tabel 5.8 Interpretasi Hasil Spektra Massa Senyawa BATU-3.....	76
Tabel 5.9 Pola Fragmentasi Senyawa BATU-3.....	77
Tabel 5.10 Skor Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> Setelah Perlakuan.....	88

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pewarnaan Gram dari <i>E. coli</i> Terlihat Basil Gram Negatif (2 µm x 0,5 µm) (Elliot, <i>et al.</i> , 2011).....	11
Gambar 2. 2 Karakteristik Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif (Hiremath & Bannigidad, 2011).....	13
Gambar 2.3 <i>E. coli</i> dalam media <i>MacConkey Agar</i> (Baban, 2017) .....	15
Gambar 2.4 <i>E. coli</i> dalam media <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> (Rath <i>et al.</i> , 2014) .....	16
Gambar 2.5 Tahap Penemuan Obat dan Proses Pengembangan Obat (Deore <i>et al.</i> , 2019) .....	20
Gambar 2.6 Skema Reaksi <i>Schotten-Bauman</i> (Wang, 2010) .....	28
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	43
Gambar 4.1 Prosedur Penelitian.....	51
Gambar 4.2 Prosedur Sintesis Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.....	52
Gambar 4.3 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT .....	53
Gambar 4.4 Prosedur Uji Kemurnian dengan Melting Point .....	53
Gambar 4.5 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV....	54
Gambar 4.6 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR .....	54
Gambar 4.7 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Magnit inti.....	55
Gambar 4.8 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa .....	55
Gambar 4.9 Prosedur Pewarnaan Gram Bakteri .....	56
Gambar 4.10 Prosedur Kultur Isolat Bakteri pada media <i>MacConkey Agarr</i> .....	57
Gambar 4.11 Prosedur Kultur Isolat Bakteri pada media <i>Eosin Methylene Blue Agari</i> .....	57

Gambar 4.12 Prosedur Preparasi Kultur Bakteri .....	58
Gambar 4.13 Prosedur Preparasi <i>Suspending Agent</i> Tween 80 0.4% .....	59
Gambar 4.14 Prosedur Preparasi Kontrol Bakteri .....	59
Gambar 4.15 Preparasi Senyawa Pembanding .....	60
Gambar 4.16 Preparasi Suspensi Kontrol BATU-3 .....	60
Gambar 4.17 Preparasi Suspensi Uji BATU-3 .....	61
Gambar 4.18 Uji Aktivitas Antibakteri (Metode Dilusi Agar).....	62
Gambar 5.1 Uji KLT refluks BATU-3 selama 4 jam ( $t_0 - t_4$ ) .....	65
Gambar 5.2 Bentuk Kristal BATU-3 (setelah rekristalisasi) secara makroskopis .....	66
Gambar 5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan Metode KLT .....	68
Gambar 5.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektrofotometri UV .....	70
Gambar 5.5 Spektra IR Senyawa BATU-3 .....	72
Gambar 5.6 Spektra $^1\text{H-NMR}$ BATU-3 .....	73
Gambar 5.7 Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa BATU-3.....	75
Gambar 5.8 Spektra Massa Senyawa BATU-3 .....	76
Gambar 5.9 Struktur Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea .....	78
Gambar 5.10 Gambaran Mikroskopik Pewarnaan Gram Isolat Bakteri <i>Escherichia coli</i> kode 1223) (Perbesaran 1000x) .....	80
Gambar 5.11 Kultur Isolat 1223 Pada Media <i>MacConkey Agar</i> (MAC) .....	81
Gambar 5.12 Kultur Isolat 1223 Pada Media <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> (EMB) .....	82
Gambar 5.13 Hasil Uji Pada Kontrol Bakteri, Kontrol Agar, dan Kontrol BATU-3 .....	83
Gambar 5.14 Hasil Uji Pada Pembanding Gentamisin .....	84
Gambar 5.15 Hasil Uji Pada Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.....	87

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Jumlah Bahan untuk Sintesis .....	122
Lampiran 2. Perhitungan Hasil Sintesis .....	123
Lampiran 3. Surat Bukti Kelayakan Etik .....	124
Lampiran 4. Dokumentasi Hasil Sintesis .....	125
Lampiran 5. Hasil Uji Kemurnian Kristal BATU-3 .....	129
Lampiran 6. Spektra Hasil Spektrofotometer UV .....	131
Lampiran 7. Spektra Hasil Spektrofotometri IR .....	132
Lampiran 8. Spektra Hasil Spektrofotometri $^1\text{H}$ -NMR .....	133
Lampiran 9. Spektra Hasil Spektrofotometri $^{13}\text{C}$ -NMR .....	138
Lampiran 10. Spektra Hasil Spektrometri Massa .....	140
Lampiran 11. Hasil Uji Identifikasi Bakteri .....	142
Lampiran 12. Hasil Uji Aktivitas Anttibakteri dengan Metode Dilusi Agar .....	144



## DAFTAR SINGKATAN

CFU	<i>Colony Form Unit</i>
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HKSA	Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas
ISK	Infeksi Saluran Kemih
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IR	<i>Infrared</i>
KHM	Kadar Hambat Minimum
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LBDD	<i>Ligand-Based Drug Design</i>
LCMS	<i>Liquid-Chromatography Mass Spectrometer</i>
LPS	Lipopolisakarida
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
MAC	<i>MacConkey Agar</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistance</i>
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
R <sub>f</sub>	<i>Refraction factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>Messenger-Ribonucleic Acid</i>
rRNA	<i>Ribosome-Ribonucleic Acid</i>
SN	Substitusi Nukleofilik
TEA	<i>Trietilamine</i>
THF	Tetrahidrofur
TMS	Tetrametilsilan
tRNA	<i>Transfer-Ribonucleic Acid</i>

UV	<i>Ultraviolet</i>
WFI	<i>Water for Injection</i>

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang Masalah**

Perkembangan teknologi terjadi di era modern saat ini sangat berpengaruh pada kesehatan dan kesejahteraan masyarakat. Hal ini sejalan dengan adanya kebutuhan sediaan obat baru yang semakin meningkat. Salah satu cara untuk meningkatkan kualitas kesehatan dan kesejahteraan masyarakat adalah dengan terus menemukan dan mengembangkan obat baru. Penemuan obat merupakan suatu proses yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang berguna dalam mengobati dan menyembuhkan penyakit secara terapeutik (Prakash & Devina, 2010). Penemuan obat telah berkembang melalui berbagai tahap menjadi perancangan obat yang lebih rasional dan berbasis bukti. Perancangan obat rasional dapat dilakukan berdasarkan struktur target biologis atau SBDD (*Structure-Based Drug Design*) dan berdasarkan struktur ligan atau LBDD (*Ligand-Based Drug Design*). Hubungan aktivitas struktur kuantitatif 3D (3D HKSA) dan pemodelan farmakofor adalah alat yang paling penting dan banyak digunakan dalam desain obat berbasis ligan (Aparoy, et al., 2012).

Farmakofor adalah gugus dalam suatu molekul yang bertanggung jawab atas aktivitas biologis suatu obat. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Brito *et al.* (2018), diketahui bahwa obat yang memiliki struktur tiourea dapat berperan sebagai farmakofor. Keberadaan dua unit gugus amina primer reaktif telah menjadikan tiourea sebagai prekursor yang cocok untuk sintesis banyak senyawa baru. Oleh karena itu turunan tiourea sering digunakan

sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) untuk mengembangkan obat baru. Turunan tiourea diketahui memiliki potensi sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat *DNA gyrase* dan *Topoisomerase IV* pada sel bakteri *E. coli* (Hashem, *et al.*, 2020; Arslan, *et al.*, 2009). Sementara itu, sintesis pada penelitian ini menggunakan metode *Schotten-Baumann* yang dimodifikasi dan telah digunakan oleh penelitian sebelumnya terhadap senyawa turunan tiourea. Pada penelitian tersebut, telah dibuktikan bahwa modifikasi struktur dari sintesis yang dilakukan mampu mengembangkan senyawa baru yang memiliki aktivitas analgesik yang baik (Shalas., *et al*, 2016).

Modifikasi struktur dilakukan pada senyawa tiourea untuk mendapatkan senyawa benzoiltiourea yang memiliki efek sebagai antibakteri. Perubahan struktur suatu senyawa akan mengubah sifat lipofilik, elektronik, dan sterik yang termasuk dalam sifat fisikokimia suatu senyawa. Adanya perubahan sifat fisikokimia ini dapat menyebabkan perubahan pada aktivitas biologis dari senyawa tersebut (Siswandono & Soekardjo, 2000). Berdasarkan pada studi aktivitas antibakteri dari turunan benzoiltiourea yaitu 1-alil-3-(2-klorobenzoil)tiourea yang dilakukan oleh Shalas *et al.* (2016), menunjukkan bahwa penambahan alil, kloro, dan cincin benzena dapat meningkatkan aktivitas biologisnya. Penelitian lain yang dilakukan oleh Atiş *et al.* (2012) juga menunjukkan bahwa penambahan halogen (F, Cl, Br, dll) dapat meningkatkan efek aktivitas antibakterinya pada senyawa 1-benzoil-3-(5-kloro-2-hidroksifenil)tiourea.

Atas dasar penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti, maka dilakukan modifikasi struktur dengan beberapa cara diantaranya menambahkan substituen *allyl* untuk peningkatan lipofilik suatu

senyawa, penambahan benzoil untuk meningkatkan sifat sterik pada senyawa, dan penambahan halogen pada posisi *meta*- untuk mempengaruhi efek elektronik dari suatu senyawa (Shalas, *et al.*, 2018; Shalas, *et al.*, 2016; Siswandono & Soekardjo, 2000). Selain itu, sifat lipofisitas dari posisi *meta*- juga menjadi salah satu faktor yang mendukung aktivitas struktur tersebut sebagai antibakteri, terutama pada bakteri Gram negatif (Malik, *et al.*, 2012).

Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang berbeda dengan bakteri Gram positif. Dinding sel adalah penghalang utama yang harus dilawan oleh agen antibakteri. Bakteri Gram negatif memiliki membran tambahan yang disebut dengan membran luar. Membran luar ini terletak di atas dan menutupi membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan. Membran luar memiliki distribusi lipid asimetris dengan fosfolipid dan lipopolisakarida (LPS) yang masing-masing terletak pada selebaran dalam dan luar. Adanya LPS pada bakteri Gram negatif memudahkan agen antibakteri dengan lipofilisitas yang baik untuk dapat menembus dinding bakteri Gram negatif. Salah satu bakteri yang termasuk bakteri Gram negatif adalah *E. coli* (Martinez de Tejada, *et al.*, 2012).

*E. coli* termasuk dalam bakteri Gram negatif yang merupakan flora normal pada pencernaan manusia. Namun, faktor virulensi yang dimiliki *E. coli* menyebabkan peningkatan invasi dan kolonisasi bakteri pada saluran kemih manusia sehingga bakteri berubah menjadi patogen. Hal inilah yang bertanggung jawab terhadap terjadinya infeksi pada saluran kemih (ISK) manusia (Arvivo & Dwiningtyas, 2019). ISK adalah salah satu infeksi yang paling sering menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas dunia. Angka kejadian tertinggi ISK di Indonesia yaitu mencapai 39-60% dan dalam 100.000

populasi, ditemukan 90 – 100 pada tahun 2014 (Musdalipah, 2018; Adnan, 2019). Sementara itu, pada tahun 2017 telah ditemukan 10.000 kasus ISK di Jawa Timur dengan presentasi wanita lebih tinggi daripada laki-laki. Penyakit ini pun menjadi alasan kedua paling umum persepsian antibiotik empiris serta pendorong utama penggunaan antibiotik, salah satunya adalah gentamisin (Ana, *et al.*, 2020).

Gentamisin merupakan antibiotik spektrum luas dari golongan aminoglikosida dan bersifat sebagai bakterisida. Dalam beberapa pedoman, dikatakan bahwa gentamisin dianggap sebagai *first-line treatment* untuk pasien ISK yang membutuhkan terapi antibiotik parenteral (Salas-Mera, *et al.*, 2017; Ramlakhan, *et al.*, 2014). Gentamisin lebih disukai karena kemanjurannya, tingkat resistensi yang rendah, mudah ditemukan, serta harganya yang cukup murah. Selain gentamisin, terdapat beberapa antibiotik yang dianggap mampu mengatasi ISK. Namun, berbeda dengan gentamisin yang masih dinilai cukup sensitif dalam mengatasi ISK, golongan antibiotik lain seperti penisilin, kuinolon, sefalopirin dan beberapa lainnya telah mengalami resisten antibiotik atau *multidrug-resistant E. coli* (Shahid & Cooke, 2007).

MDR *E. coli* didefinisikan sebagai tidak sensitifnya *E. coli* terhadap setidaknya satu agen dalam tiga atau lebih kategori antibiotik. Isolat *E. coli* menunjukkan MDR *E. coli* pada beberapa antimikroba seperti ampisilin, kotrimoksazol, augmentin, nitrofurantoin, ciprofloxacin dan sefazolin. Tingkat resistensi tertinggi ditempati oleh ampisilin (63,64%) dan kotrimoksazol (59,09%) pada *E. coli* yang diisolasi dari pediatrik, orang dewasa, dan lanjut usia (Alanazi *et al.*, 2018). Terjadinya resistensi antibiotik didukung dengan

penggunaan antibiotik, pemberian resep yang berlebihan, dan penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Zarfel, *et al.*, 2013; Titilawo, *et al.*, 2015; Zhang, *et al.*, 2015). Munculnya resisten pada *strain* bakteri telah membatasi kemampuan antibakteri untuk mengobati penyakit ISK, sehingga sangat diperlukan antibakteri baru yang setara dengan gentamisin untuk mengatasi masalah ini (Bello *et al.*, 2018).

Pengujian aktivitas antibakteri baru dapat dilakukan dengan metode dilusi agar. Metode dilusi agar dianggap sebagai metode yang paling tepat untuk uji aktivitas antibakteri karena metode ini memungkinkan penilaian kuantitatif kerentanan antibakteri dengan menentukan konsentrasi terendah dari agen antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri atau yang digambarkan sebagai kadar hambat minimum (KHM). Selain itu, bentuk senyawa uji yang merupakan suspensi menjadi salah satu pertimbangan penggunaan metode ini. Senyawa dalam bentuk suspensi akan lebih mudah terdispersi secara seragam ke dalam agar (Chikezie, 2017; Golus, *et al.*, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian mengenai sintesis dan uji aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap *E. coli* yang merupakan turunan dari N-benzoiltiourea. Hasil penelitian diharapkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat menjadi alternatif antibakteri baru yang mampu mengatasi masalah ISK yang disebabkan oleh *E. coli*.

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik antara aliltiourea dengan 3-klorobenzoil klorida?
- 1.2.2 Apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki aktivitas antibakteri yang ditentukan berdasarkan Kadar Hambat Minimum (KHM) terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223?
- 1.2.3 Apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki nilai KHM yang sebanding dengan KHM antibiotik gentamisin terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea sebagai senyawa penuntun antibakteri baru dan mengetahui aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- 1.3.2.1 Mendapatkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea melalui reaksi substitusi nukleofilik antara aliltiourea dengan 3-klorobenzoil klorida
- 1.3.2.2 Mengetahui aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea berdasarkan Kadar Hambat Minimum (KHM) terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223.



**1.3.2.3** Mengetahui nilai KHM senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea sebanding dengan nilai KHM antibiotik gentamisin terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Manfaat akademik yang diharapkan pada penelitian ini adalah dapat menjadi dasar dan potensi bagi penelitian-penelitian selanjutnya mengenai pengembangan obat dengan metode sintesis pada senyawa turunan benzoiltiourea yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah sebagai acuan atau referensi dasar dalam pengembangan penelitian obat baru, terutama antibakteri untuk mengatasi resistensi bakteri *Escherichia coli*.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Infeksi Bakteri**

Infeksi bakteri adalah kombinasi dari keberadaan bakteri dan inflamasi (peradangan) atau disfungsi sistemik yang biasanya diperlukan lebih dari satu modalitas diagnostik untuk mengkonfirmasi adanya infeksi bakteri (Boyles & Wasserman, 2015). Semua manusia terinfeksi bakteri, baik yang hidup sebagai flora normal maupun yang masuk dari lingkungan luar melalui kulit, usus, dan paru-paru. Sistem imun dalam tubuh manusia dapat menghambat bakteri yang masuk, namun bila imunitas melemah, maka bakteri dapat masuk ke dalam darah dan menyebabkan infeksi oportunistik (Carroll & Hobden, 2016).

Organisme yang dapat menyebabkan penyakit dengan tingkat keparahan gejala penyakit melalui berbagai cara pada inangnya disebut dengan patogen. Terjadinya kerusakan pada jaringan dan sel inang merupakan salah satu cara patogen menyebabkan penyakit (Balloux and van Dorp, 2017). Proses bakteri menyebabkan penyakit pada manusia disebut dengan patogenesis. Patogenesis adalah proses multi-faktorial yang tergantung pada status kekebalan inang, sifat spesies (faktor virulensi), dan jumlah organisme dalam paparan awal. Proses patogenesis melibatkan berbagai langkah yang dimulai dengan penularan agen infeksi (bakteri) ke inang, diikuti oleh kolonisasi. Setelah kolonisasi inang, bakteri tetap melekat

di lokasi kolonisasi kemudian menyerang sistem inang. Setelah lolos dari sistem kekebalan tubuh inang, ia siap untuk menyebabkan penyakit (Carroll & Hobden, 2016).

## **2.2 Infeksi Saluran Kemih**

### **2.2.1 Definisi**

ISK adalah infeksi bakteri nomor dua yang paling umum terjadi setelah infeksi saluran pernafasan. ISK sering kali kambuh, sulit diobati, dan dapat menyebabkan kerusakan parenkim pada ginjal, yang menyebabkan komplikasi lebih lanjut. ISK diketahui merupakan peringkat infeksi bakteri nomor satu yang memberikan resep antibiotik setelah kunjungan dari dokter (Lee & Le, 2018). Secara normal, pada saluran kemih tidak terdapat pertumbuhan bakteri, namun bakteri yang naik dari rektum dapat mengakibatkan terjadinya infeksi pada saluran kemih. Infeksi saluran kemih dapat terjadi ketika imun dari inang menurun yang diikuti oleh inokulasi dan kolonisasi bakteri (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Secara umum, uropatogen dominan untuk ISK adalah bakteri Gram negatif dengan *Escherichia coli* yang menjadi prevalensi tertinggi di sebagian besar kejadian. Pengobatan pertama ISK menggunakan antibiotik spektrum luas yang kemudian diturunkan ke antibiotik spesifik berdasarkan informasi yang diperoleh dari pola kerentanan antimikroba dari patogen urin. Penggunaan agen antimikroba yang tersebar luas telah menyebabkan munculnya patogen yang resisten terhadap antibiotik sehingga meningkatkan permintaan obat baru (Chooramani, *et al.*, 2020).

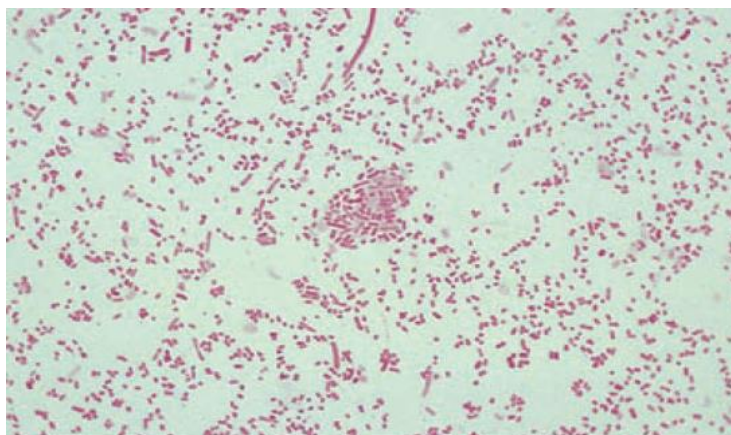
### 2.2.2 Patofisiologi

Infeksi saluran kemih secara signifikan lebih banyak terjadi pada wanita daripada pria. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan anatomi, termasuk pada panjangnya uretra yang lebih pendek pada wanita daripada pria, serta lingkungan *periurethral* yang lembab pada wanita. Infeksi ini biasanya disebabkan oleh *E. coli uropathogenic* yang memiliki fimbriae (pili) yang dapat memfasilitasi kolonisasi bakteri dan perlekatan pada area periuretra, uretra, dan dinding kandung kemih. Tak hanya itu bakteri ini menghasilkan polisakarida kapsul yang dapat menghambat fagositosis dan berhubungan dengan perkembangan pielonefritis. Selain itu, bakteri ini pun menghasilkan hemolisin yang bersifat sitotoksik sehingga mengakibatkan terjadinya invasi jaringan (Elliot, *et al.*, 2011).

ISK biasanya dimulai dengan kontaminasi *periurethral* oleh uropatogen yang berada di usus, yang kemudian naik ke uretra diikuti oleh kolonisasi uretra dan terjadi penempelan pili pada kandung kemih. Setelah itu, *Escherichia coli* menyerang epitel kandung kemih, menghasilkan racun dan protease untuk melepaskan nutrisi dari sel inang, setelah itu bakteri akan mensintesis siderofor untuk mendapatkan zat besi. Kemudian uropatogen dapat naik ke ginjal dan menyerang epitel ginjal dengan menghasilkan toksin yang merusak jaringan. Pada akhirnya uropatogen berhasil melewati epitel tubuluran dan masuk ke aliran darah (Flores-Mireles, *et al.*, 2015).

### 2.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) adalah bakteri Gram negatif tidak berspora yang termasuk dalam bakteri anaerob fakultatif dan biasa menjadi flora normal di usus besar dan secara alami dieksresikan dalam feses (Woodward, 2015; Von Wuffen, *et al.*, 2016). Peran *E. coli* sebagai flora normal yaitu menghasilkan senyawa kolisin yang berfungsi untuk melindungi saluran gastrointestinal dari bakteri patogen (Sutiknowati, 2016). Bentuk *E. coli* sangat kecil, selnya berbentuk batang yang berukuran sekitar 2,5  $\mu\text{m}$  – 10.000 sel menjadi sepanjang 1 inci dengan diameter sekitar 0.8  $\mu\text{m}$ , dan bagian ujung berbentuk setengah bulat. Saat sel tumbuh, ia menjadi lebih panjang dan kemudian membelah di tengah. Sel memiliki dinding tipis tiga lapis yang disebut dengan sitoplasma dan tidak memiliki nukleus. *E. coli* memiliki organel luar berupa filamen lurus tipis yang disebut dengan pili yang memungkinkannya untuk menempel pada substrat tertentu. Organel luar lainnya berupa filamen heliks yang lebih tebal dan lebih panjang, yang disebut dengan flagela, yang memungkinkannya berenang (Nakamura and Minamino, 2019).



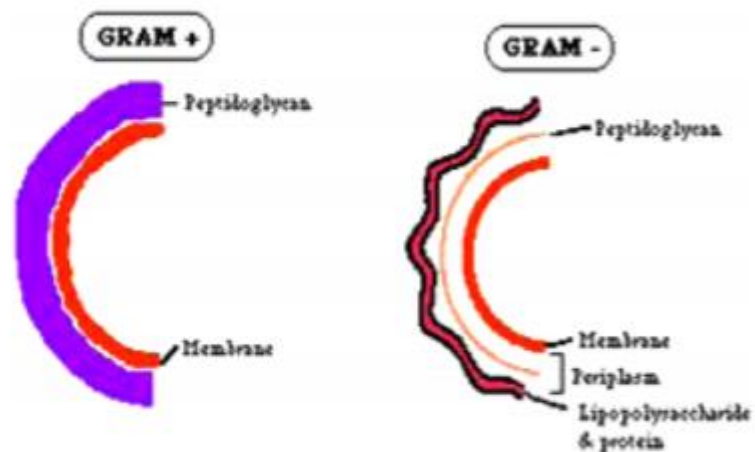
**Gambar 2.1 Pewarnaan Gram dari *E. coli* Terlihat Basil Gram Negatif (2  $\mu\text{m}$  x 0,5  $\mu\text{m}$ ) (Elliot, *et al.*, 2011)**

Meskipun *E. coli* adalah flora normal yang tidak berbahaya, beberapa strain dapat menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan, saluran kemih, meningitis, dan lainnya (Elliot, *et al.*, 2011). *E. coli* khas yang menyebabkan sebagian besar ISK disebut uropatogenik *E. coli* (UPEC). Mereka memiliki beragam faktor terkait virulensi (VF) yang membantu mereka menempel, menyerang, dan melukai inang. VF UPEC dikelompokkan berdasarkan kategori fungsional sebagai adhesin, *toxins*, *iron acquisition systems*, dan protektin. VF dikodekan oleh gen yang terletak pada kromosom atau plasmid. Akibatnya VF dapat ditularkan secara vertikal atau horizontal yang selanjutnya berkontribusi dalam patogenesis VF (Kudinha, 2017).

### 2.3.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan teknik pewarnaan diferensial yang membagi bakteri menjadi dua kelompok besar, yaitu Gram positif dan Gram negatif sebagai langkah awal untuk menentukan identitas sampel bakteri tertentu. Metode ini merupakan metode empiris untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok besar berdasarkan sifat kimia dan fisik dinding selnya. Dinding sel Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang sangat tebal dan berfungsi untuk retensi pewarnaan kristal violet selama prosedur pewarnaan Gram, sehingga bakteri Gram positif mampu mempertahankan warna primer atau kristal violet yang diberikan. Kebalikan dari Gram positif, Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan tipis dan berdekatan dengan membran sitoplasma. Peptidoglikan yang tipis membuat dinding sel bakteri Gram negatif tidak mampu untuk mempertahankan noda kristal violet pada penghilangan warna dengan

etanol selama pewarnaan Gram (Hiremath & Bannigidad, 2011). Hal ini menyebabkan sel-sel kaya lipid berdinding tipis pada Gram negatif kehilangan noda kristal violet dan tampak berwarna merah dari pewarnaan sekunder dengan *counterstain* (Thairu, *et al.*, 2014).



**Gambar 2. 2 Karakteristik Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif (Hiremath & Bannigidad, 2011)**

### 2.3.2 Medium Pertumbuhan Bakteri *E. coli*

Kultur mikroba hanya mungkin jika media kultur yang sesuai tersedia. Media kultur adalah sediaan padat atau cair yang digunakan untuk menumbuhkan, mengangkut, dan menyimpan mikroorganisme. Agar efektif, media harus mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhan. Media khusus sangat penting dalam isolasi dan identifikasi mikroorganisme, pengujian kepekaan antibiotik, analisis air dan makanan, industri mikrobiologi, dan aktivitas lainnya. Seringkali, suatu media digunakan untuk menyeleksi dan menumbuhkan mikroorganisme tertentu atau untuk membantu mengidentifikasi spesies

tertentu. Media kultur dapat diklasifikasikan berdasarkan beberapa parameter diantaranya berdasarkan unsur kimia darimana bahan tersebut dibuat, sifat fisik maupun fungsinya (Willey, *et al.*, 2014)

Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme tertentu, terutama yang berasal dari penderita penyakit menular, *selective*, *differential*, atau *enrichment medium* sering digunakan. Media khusus seperti itu merupakan bagian penting dari mikrobiologi diagnostik modern. *Selective medium* adalah media yang mendorong pertumbuhan beberapa organisme, tetapi menekan pertumbuhan organisme lain. *Differential medium* adalah media yang memiliki konstituen yang menyebabkan perubahan yang dapat diamati (perubahan warna atau perubahan pH) pada media ketika reaksi biokimia tertentu terjadi. Perubahan ini memungkinkan ahli mikrobiologi untuk membedakan jenis koloni tertentu dari koloni lain yang tumbuh di lempeng yang sama. Sementara itu, *enrichment medium* mengandung nutrisi khusus yang memungkinkan pertumbuhan organisme tertentu yang mungkin tidak hadir dalam jumlah yang cukup untuk memungkinkannya diisolasi dan diidentifikasi. Berbeda dengan *selective medium*, *enrichment medium* tidak menekan pertumbuhan organisme lain (Black, 2008).

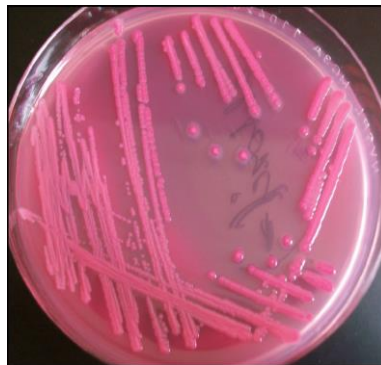
*E. coli* adalah bakteri Gram negatif yang bersifat aerob dan anaerob fakultatif. Bakteri ini tumbuh dalam rentang temperatur 10-40°C (optimum pada 37°C) dan pada pH 7,2. Selain itu, *E. coli* juga merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memfermentasi laktosa. Oleh karena itu, untuk mengidentifikasi bakteri ini, diperlukan *selective* dan *differential*



*medium* agar dapat dibedakan dengan bakteri Gram negatif lain (Black, 2008).

#### **2.3.2.1 MacConkey Agar**

Media kultur yang sangat banyak digunakan untuk mengisolasi *E. coli* pasien dengan ISK adalah *MacConkey Agar*. *MacConkey Agar* termasuk dalam *differential* dan *selective medium* yang mengandung kristal violet dan garam empedu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif sekaligus memungkinkan pertumbuhan Gram negatif. Agar *MacConkey* juga mengandung gula laktosa dan indikator pH yang mengubah koloni fermentor laktosa menjadi merah dan membuat koloni nonfermenter tidak berwarna serta tembus cahaya. Saat *E. coli* memfermentasi laktosa, hal itu menyebabkan pH turun dan indikator pH berubah menjadi ungu atau merah mudah cerah (Black, 2008)

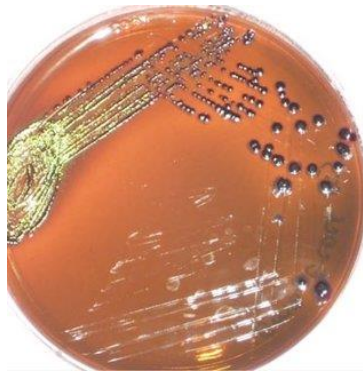


**Gambar 2.3 *E. coli* dalam media *MacConkey Agar* (Baban, 2017)**

#### **2.3.1.2 Eosin Methylene Blue Agar**

Media *Eosin Methylene Blue Agar* merupakan *selective* dan *differential medium* untuk bakteri Gram negatif. Media ini dapat mencegah pertumbuhan organisme Gram positif. Media ini merupakan media yang

cocok untuk *E. coli* yang merupakan Gram negatif penghasil asam dari kemampuannya memfermentasi laktosa (karbohidrat laktosa). Pada peningkatan asam tinggi terjadi penyerapan pada pewarna *eosin* dan *methylene blue* oleh koloni, sehingga *E. coli* memiliki pusat gelap dan kilau kehijauan metalik (*green metallic sheen*) (Black, 2008). Sementara itu, bakteri *coliform* lain akan menghasilkan koloni kental, berlendir, berwarna merah muda pada media ini, sedangkan pada bakteri enterik yang tidak memfermentasi laktosa menghasilkan koloni yang tidak berwarna, namun karena transparansinya sehingga bakteri tampak berwarna ungu yang sama dengan media (Cappuccino & Welsh, 2017).



**Gambar 2.4 *E. coli* dalam media *Eosin Methylene Blue Agar* (Rath et al., 2014)**

## **2.4 Antibakteri**

Agen antibakteri memainkan peran kunci dalam mengendalikan dan menyembuhkan penyakit menular. Antibakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan mekanismenya yaitu sebagai bakteriostatik dan bakterisidal. Antibakteri yang menghancurkan bakteri dengan menargetkan dinding sel atau membran sel bakteri disebut bakterisidal, sedangkan yang

memperlambat atau menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai bakteriostatik. Penghambatan agen bakteriostatik melibatkan penghambatan sintesis protein atau beberapa jalur metabolisme bakteri (Ullah and Ali, 2017).

Pada pasien dengan ISK, salah satu antibiotik yang biasa digunakan untuk mengatasi ISK adalah antibiotik golongan aminoglikosida. Aminoglikosida termasuk antibiotik spektrum luas yang paling umum digunakan dalam mengatasi infeksi. Aminoglikosida diketahui menjadi *first-line* untuk pasien rawan jalan ISK yang membutuhkan terapi antibiotik parenteral (Salas-Mera *et al.*, 2017). Antibiotik golongan aminoglikosida bekerja dengan cara menghambat sintesis protein di dalam bakteri dengan mengikat secara *irreversible* ke situs-A pada RNA ribosom 16S dari subunit ribosom 30S. Ikatan ini akan menghambat transfer aminoasil-tRNA ke tempat penempelan *peptidyl* yang menyebabkan penghentian mendadak rantai peptide sehingga meningkatkan frekuensi kesalahan baca dari mRNA. Selain itu, aminoglikosida juga dapat merusak membran sel bakteri dan menyebabkan kebocoran isi intraseluler. Aminoglikosida bersifat bakterisidal dan aktif melawan banyak bakteri Gram negatif (termasuk spesies *Pseudomonas* dan famili Enterobacteriaceae). Golongan aminoglikosida yang paling banyak digunakan adalah gentamisin (Waller & Sampson, 2018). Kebanyakan antibiotik yang menargetkan ribosom adalah bakteriostatik, sedangkan aminoglikosida adalah penghambat translasi unik yang menyebabkan aktivitas "sidal".

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang menunjukkan aktivitas bakterisidal melawan bakteri Gram negatif aerob

sehingga obat ini menjadi pilihan yang baik untuk mengobati beberapa infeksi umum, salah satunya ISK. Gentamisin memiliki absorpsi *gastrointestinal* yang minimal, oleh karena itu pemberiannya dilakukan melalui rute parenteral. Gentamisin lebih disukai karena kemanjurannya, tingkat resistensi yang rendah, mudah ditemukan, serta harganya yang cukup murah (Shahid & Cooke, 2007). Gentamisin bekerja dengan melewati membran bakteri Gram negatif dalam transport aktif yang bergantung pada oksigen. Begitu berada di dalam sitoplasma, mekanisme kerja gentamisin hampir sama dengan golongan aminoglikosida lain, yakni berikatan dengan 16S rRNA di subunit ribosom 30-an untuk mengganggu penerjemahan mRNA yang menyebabkan terganggunya pembentukan protein yang akhirnya mengakibatkan kematian bakteri (Chaves & Tadi, 2021). Pada CLSI (2017), *E. coli* yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae dikatakan sensitif terhadap gentamisin bila nilai KHM  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  dan dikatakan tidak sensitive jika nilai KHM gentamisin  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ . Oleh karena itu, pada uji aktivitas antibakteri dengan dilusi agar dalam penelitian ini, digunakan serial konsentrasi pada gentamisin dengan mengambil 2 konsentrasi diatas dan 2 konsentrasi dibawah KHM.

## 2.5 ***Multidrug-Resistant E. coli***

Resistensi antimikroba dalam berbagai agen infeksius merupakan ancaman kesehatan masyarakat yang mengundang perhatian luas dari berbagai sektor. Penggunaan berlebihan pada suatu antimikroba dapat meningkatkan pertumbuhan resistensi obat pada strain bakteri. Bakteri yang resisten bertanggung jawab atas infeksi yang lebih sulit diobati,

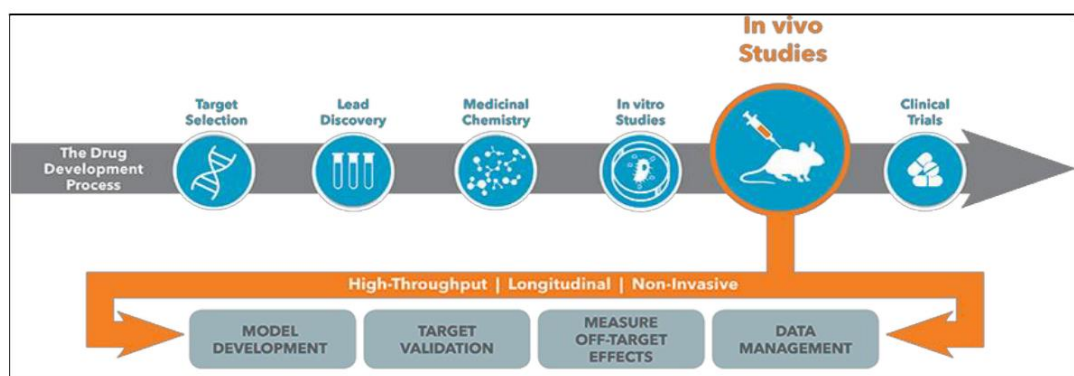
sehingga membutuhkan penggunaan obat yang lebih *toxic* dan lebih mahal. Dalam beberapa kasus, bakteri menjadi kebal terhadap semua antibiotik yang diketahui atau biasa disebut dengan *multidrug-resistance* (MDR) (Serwecinska, 2020). Plasmid pada bakteri berperan penting dalam resisten antibiotik. Plasmid mampu menyebarkan gen resisten antibiotik pada berbagai spesies dan genus lain yang bukan subjek pemberian antibiotik (Aminah, 2015).

Secara umum, resistensi antimikroba pada *E. coli* dianggap sebagai salah satu tantangan utama pada manusia dan hewan dalam skala dunia dan perlu dipertimbangkan sebagai masalah kesehatan masyarakat yang nyata. Munculnya resistensi pada bakteri ini memerlukan studi evolusi sepanjang waktu untuk membangun pengobatan empiris yang sesuai. Dalam beberapa tahun terakhir, telah terjadi peningkatan dramatis dalam prevalensi patogen urin *E. coli* yang menimbulkan tantangan klinis yang cukup serius di rumah sakit (Kassakian and Mermel, 2014). *E. coli* bertindak sebagai donor dan penerima gen resistensi yang artinya bakteri ini mampu memperoleh gen resistensi dari bakteri lain dan dapat meneruskan gen resistensinya ke bakteri lain. *E. coli* secara intrinsik dapat diatasi oleh hampir seluruh agen antimikroba yang relevan secara klinis, tetapi spesies bakteri ini memiliki kapasitas besar untuk mengakumulasi gen resistensi melalui transfer gen horizontal. (Waller & Sampson, 2018).

## **2.6 Penemuan Senyawa**

Penemuan obat adalah proses multifaset, yang melibatkan identifikasi bahan kimia obat yang berguna secara terapeutik dalam

mengobati dan menangani kondisi penyakit. Biasanya, peneliti menemukan obat baru dengan tujuan untuk menghentikan atau melawan efek penyakit. Proses penemuan obat meliputi identifikasi calon obat, sintesis, karakterisasi, skrining, dan pemeriksaan efikasi terapeutik seperti yang tertera pada Gambar 2.5. Penemuan dan pengembangan obat merupakan proses yang mahal karena tingginya anggaran litbang dan uji klinis. Selain mahalnya biaya yang diperlukan, waktu yang dibutuhkan untuk mengembangkan satu obat baru cukup banyak, yaitu sekitar 12- 15 tahun (Deore *et al.*, 2019).



**Gambar 2.5 Tahap Penemuan Obat dan Proses Pengembangan Obat (Deore *et al.*, 2019)**

### 2.6.1 *Structure-Based Drug Design*

*Structure-based drug design* (SBDD) merupakan metode yang melibatkan penggunaan informasi terkait struktur 3D target molekuler (protein) melalui metode kristalografi X-ray, spektroskopi NMR atau *modelling homolog*, yang diikuti dengan desain dari kandidat obat yang sesuai berdasarkan afinitas pengikatan dan selektivitas dari molekul targetnya. Pada SBDD digunakan metode *Fragment-based lead*

*discovery, Structure-based virtual screening, In silico structure-based lead optimization, dan ADMET modelling* (Agrawal, 2015).

### **2.6.2 Ligand-Based Drug Design**

Dalam beberapa kasus, biasanya dimana data yang berkaitan dengan struktur 3-D dari protein target tidak tersedia, desain obat malah dapat didasarkan pada proses menggunakan ligan yang diketahui dari protein target sebagai titik awal. Pendekatan ini dikenal sebagai desain obat berbasis ligan. Pendekatan kesamaan molekuler, hubungan aktivitas struktur kuantitatif (HKSA) dan model farmakofor adalah metode yang sering digunakan dalam proses desain obat berbasis ligan. Dengan menggunakan sidik jari molekuler dari ligan yang diketahui, database dapat disaring untuk menemukan molekul dengan sidik jari yang serupa. Fitur struktural umum dari ligan dapat ditemukan menggunakan pemodelan farmakofor, yang kemudian dapat digunakan untuk menyaring molekul. Untuk memprediksi aktivitas molekul baru, model dapat dibangun dengan HKSA. Sementara model farmakofor hanya dapat menunjukkan fitur pemberian aktivitas dari ligan aktif, hubungan antara sifat kimia atau fisik ligan dan aktivitas biologis dapat dieksplorasi lebih lengkap menggunakan model HKSA (Lee, *et al.*, 2011).

#### **2.6.2.1 Pharmacophore**

Farmakofor didefinisikan sebagai kerangka molekuler yang membawa fitur penting yang bertanggung jawab atas aktivitas biologis obat. Farmakofor mendefinisikan fitur-fitur penting yang harus dimiliki oleh ligan aktif. Umumnya, jenis fitur, posisi, dan arah ligan aktif akan dikodekan menjadi model farmakofor, bersama dengan kemungkinan kendala sterik

dari senyawa aktif. Farmakofor 3-D akan mencerminkan bagaimana posisi asam amino pada *active site* dari protein target. Setelah ligan mengikat protein target dalam konformasi yang benar dan berinteraksi dengan residu asam amino kunci, konformasi protein dapat berubah atau menjadi terkunci, tergantung pada mekanisme interaksi ligan-protein. Model farmakofor dapat dihasilkan dari satu set ligan yang diketahui. Namun, data yang berkaitan dengan struktur protein 3-D atau kompleks protein-ligan yang dikombinasikan dengan informasi pada *active site* juga dapat digunakan untuk memodelkan farmakofor. Dengan mempelajari *binding site*, kemungkinan interaksi antara senyawa aktif dan protein dapat disimpulkan, dan model farmakofor dapat dibangun dari data pada struktur protein target. Model farmakofor banyak digunakan untuk mendapatkan inhibitor spesifik dari protein terkait penyakit, termasuk reseptor berpasangan G-protein, enzim, dan saluran ion (Lee, *et al.*, 2011).

#### **2.6.2.2 Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Obat (HKSA)**

Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas obat (HKSA) merupakan metode untuk mencari hubungan dari suatu struktur molekul dengan aktivitas biologis atau kimia menggunakan model matematika. Jika aktivitas sekumpulan ligan dapat ditentukan, model dapat dibangun untuk mendeskripsikan hubungan ini. Tidak seperti model farmakofor, yang hanya mengkodekan fitur esensial dari ligan aktif, model HKSA memungkinkan seseorang untuk menentukan karakteristik tertentu pada aktivitas molekul. Informasi tersebut tidak tersedia dengan menggunakan model farmakofor. Setelah model HKSA dibangun dan divalidasi, model tersebut dapat memprediksi aktivitas biologis molekul baru dari sifat



strukturalnya. Model HKSA juga dapat menyaring molekul yang berpotensi aktif dari *database* (Lee, *et al.*, 2011). Hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas suatu obat melibatkan tiga parameter fisika kimia yang penting. Parameter fisika kimia yang dapat digunakan yaitu parameter hidrofobik, efek elektronik, dan efek sterik untuk memprediksi molekul obat baru yang lebih potensial (Utomo *et al.*, 2017).

## 2.7 Tiourea

Tiourea dan turunannya memainkan peran dalam bidang kimia obat serta pengembangan obat. Turunan tiourea merupakan farmakofor yang penting dalam pengembangan obat baru. Brito *et al.* (2018) menyatakan bahwa obat yang memiliki struktur tiourea dapat berperan sebagai farmakofor. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Shalas *et al.* (2016) yang menyatakan 1-alil-3-(2-klorobenzoil)tiourea merupakan salah satu senyawa dengan farmakofor tiourea. Senyawa yang mengandung gugus karbonil dan tiokarbonil menempati posisi penting di antara pereaksi organik sebagai ligan donor potensial untuk ion logam transisi. Dalam upaya mensintesis gugus aktif biologis yang potensial, tiourea dan berbagai senyawa telah memperoleh pengabdian ahli kimia yang besar dalam hal antimikroba, antikanker serta evaluasi potensi anti-inflamasi (Arslan *et al.*, 2009). Turunan tiourea diketahui memiliki potensi sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat *DNA gyrase* dan *Topoisomerase IV* pada sel bakteri *E. coli* (Hashem, *et al.*, 2020)

Tiourea merupakan salah satu senyawa yang dapat dimodifikasi strukturnya dengan melakukan sintesis. Hal ini dikarenakan tiourea memiliki dua unit gugus amina primer reaktif sehingga menjadikan tiourea

sebagai prekursor yang cocok untuk sintesis banyak senyawa baru (Arslan *et al.*, 2009). Modifikasi struktur dapat mempengaruhi sifat fisikokimia suatu senyawa yakni sifat lipofilik, elektronik dan sterik, sehingga diharapkan dapat meningkatkan aktivitas biologis dari senyawa yang diinginkan. Sifat fisikokimia suatu senyawa mempengaruhi aktivitas biologisnya terhadap reseptor. Kemampuan suatu senyawa untuk menembus membran sel dipengaruhi oleh sifat lipofilik, untuk sifat elektronik berpengaruh pada penembusan membran sel dan interaksi antara obat dan reseptor, sedangkan penentu kekuatan interaksi antara obat dan reseptor didukung dari sifat sterik (Siswandono & Soekardjo, 2000).

Pada senyawa tiourea dilakukan modifikasi struktur dengan berbagai strategi diantaranya penambahan alil, benzoil, dan kloro pada posisi *meta*-. Perubahan ukuran dan atau bentuk substituent alkil dapat dilakukan dengan cara penambahan alil. Gugus alkil dapat berikatan dengan reseptor melalui interaksi hidrofobik. Penambahan rantai alkil dapat mengubah kapasitas pengikatan dan meningkatkan sifat lipofilik dari senyawa, sehingga senyawa lebih mudah berpenetrasi ke dalam bakteri (Shalas, *et al.*, 2018). Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Rome *et al.* (2018), yang telah berhasil membuktikan bahwa penambahan alil dapat menghambat bakteri Gram negatif *E. coli* dengan mekanisme mempengaruhi metabolisme bakteri yaitu reduktase tioredoksin yang terdapat dalam dinding sel bakteri.

Selain penambahan alil, dilakukan pula penambahan benzoil dalam proses modifikasi struktur senyawa ini. Kestabilan suatu obat merupakan hal yang penting dalam mengembangkan obat baru. Penambahan gugus

benzoil dapat menstabilkan suatu molekul karena terjadi peningkatan keasaman bahan obat, sehingga aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap reseptor akan semakin kuat (Siswandono & Soekardjo, 2000). Gugus benzoil juga berpengaruh pada sifat fisikokimia lain dari senyawa yaitu dapat meningkatkan sifat sterik dan elektronik suatu senyawa. Hal ini disebabkan oleh isomer posisi dari substituen pada cincin aromatis dapat mendistribusikan elektron pada cincin aromatis. Tak hanya itu posisi substituen pada cincin aromatis juga mempengaruhi penempatan spasial dari sistem cincin, sehingga isomer pada cincin aromatis memiliki sifat farmakologi yang berbeda-beda (Shalas, *et al.*, 2018).

Strategi selanjutnya yang dapat digunakan yaitu dengan substitusi halogen pada posisi *meta*- di cincin aromatis. Halogen sering ditambahkan ke struktur senyawa karena memiliki efek sterik, elektronik, dan obstructif. Efek obstructif yang dihasilkan oleh kelompok halogen yaitu dapat mencegah reaksi metabolisme sehingga memperpanjang durasi aktivitas biologis senyawa terhadap suatu senyawa. Substituen halogen merupakan *electron withdrawing groups* yang kuat dan resonansi pendonor elektron yang lemah pada farmakofor yang mengakibatkan penurunan kerapatan pada elektron (McMurry, 2012; Shalas, *et al.*, 2016). Penambahan posisi *meta*- didapatkan bahwa aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh *meta*- dinilai lebih aktif daripada yang berada pada posisi *ortho*-. Hal ini disebabkan oleh efek sterik yang mempengaruhi aktivitas senyawa. Sifat lipofisitas dari *meta*- juga menjadi salah satu faktor yang mendukung aktivitas struktur tersebut sebagai antibakteri, terutama pada bakteri Gram negatif (Malik, *et al.*, 2012). Namun, penambahan gugus Cl pada posisi *meta* memberikan

efek induksi negatif dan resonansi positif yang dapat mempersulit jalannya reaksi dan membutuhkan waktu yang cukup lama (McMurry, 2012).

## 2.8 Benzoiltiourea

Turunan Benzoiltiourea baru-baru ini menarik minat karena memiliki potensial yang relatif terkait dalam aktivitas biologis dan bidang industri serta kimia koordinasi (Yang *et al.*, 2012). Beberapa turunan benzoiltiourea memiliki karakteristik yang hampir sama dengan redoks namun berbeda pada bentuk kristal dan struktur isomer. Turunan benzoiltiourea memiliki momen dipol besar serta memiliki sifat sebagai antibakteri, antijamur, dan aktivitas insektisida. Turunan benzoiltiourea umumnya digunakan untuk transisi ion logam dengan atom donor N, O, S. Selain itu, turunan benzoiltiourea juga memiliki ikatan hidrogen intramolekul dan intermolekul yang mana ikatan hidrogen intramolekul biasanya terjadi antara oksigen karbonil dan atom hidrogen pada atom nitrogen yang terbaca pada sinyal  $^1\text{H}$  NMR untuk N-H *shifted downfield* (Kurt, *et al.*, 2009). Turunan benzoiltiourea dengan kelompok substituen yang melepaskan elektron pada cincin aromatik menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan total terhadap mikroorganisme bakteri (Bielenica *et al.*, 2018).

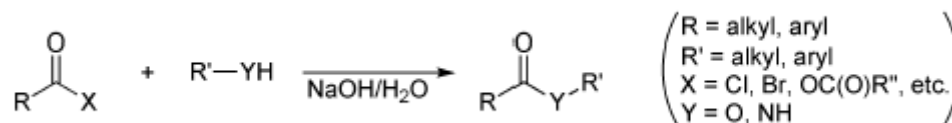
Berdasarkan pada studi aktivitas antibakteri dari turunan benzoiltiourea yaitu 1-alil-3-(2-klorobenzoil)tiourea yang dilakukan oleh Shalas, *et al.* (2016), menunjukkan bahwa penambahan alil, kloro, dan cincin benzena dapat meningkatkan aktivitas biologisnya. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh (Atiş *et al.*, 2012) juga menunjukkan bahwa penambahan halogen (F, Cl, Br, dll) dapat meningkatkan efek aktivitas antibakterinya pada senyawa 1-benzoil-3-(5-kloro-2-hidroxifenil)tiourea.

Selain itu, ditemukan bahwa gugus fungsi karboniltioamida dari turunan benzoiltiourea dengan gugus substituen pelepas elektron pada cincin aromatik menunjukkan penghambatan pertumbuhan lengkap terhadap mikroorganisme bakteri dan jamur (Abosadiya, *et al.*, 2019).

## 2.9 Sintesis Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

Sintesis dapat menghasilkan molekul baru yang dibutuhkan sebagai bahan obat. Untuk menetapkan suatu bahan kimia baru, dapat dirancang sintesis dengan berbagai metode dan melakukan uji untuk meningkatkan efisiensi dari bahan kimia tersebut. Sintesis yang sangat bagus dapat digunakan untuk menguji ide dan metode baru. Sintesis 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea didapatkan menggunakan metode *Schotten-Bauman* yang dimodifikasi. Metode *Schotten-Bauman* merupakan pembentukan amida dari asam klorida dan amina yang dinetralkan dengan basa katalis (Wang, 2010). TEA berperan sebagai basa katalis untuk menetralkan proton yang dihasilkan selama reaksi benzoilasi (Shalas, *et al.*, 2018). Reaksi yang terjadi adalah reaksi substitusi nukleofilik tipe 2 yang berjalan secara satu tahap.

Reaksi dilakukan dengan menambahkan 3-klorobenzoil klorida dalam tetrahidrofur sebagai pelarut yang telah direaksikan dengan aliltiourea dan trietilamin tetes demi tetes sehingga terjadi reaksi substitusi nukleofilik. Setelah itu, campuran direfluks dan pelarut diuapkan, kemudian produk dicuci dengan natrium karbonat dan direkristalisasi dengan pelarut yang sesuai (Shalas, *et al.*, 2016).



**Gambar 2.6 Skema Reaksi *Schotten-Bauman* (Wang, 2010)**

## 2.10 Substitusi Nukleofilik

Reaksi substitusi merupakan pergantian dari sebuah atom atau gugus pereaksi yang menggantikan atom atau gugus molekul bereaksi. Pada reaksi substitusi nukleofilik terjadi pergantian pada atom atau gugus yang memiliki elektronegativitas lebih besar dari atom C, yang digantikan dengan suatu nukleofilik. Nukleofilik adalah suatu atom/ion/molekul yang memiliki pasangan elektron bebas, yang bereaksi dengan substrat (alkil halida) dengan mengganti substiuen halogen (*leaving group*) (Bruckner, 2010).

Reaksi substitusi nukleofilik dibagi menjadi dua kemungkinan, yaitu substitusi unimolekuler (SN-1) dan reaksi substitusi nukleofilik bimolekuler (SN-2). Reaksi SN-1 terjadi secara bertahap, dimana (1) terputusnya *leaving group* untuk membentuk karbokation yang diikuti oleh (2) serangan nukleofilik pada karbokation yang akan menghasilkan produk. Peningkatan atau penurunan konsentrasi nukleofil tidak memiliki efek pada laju. Persamaan laju dikatakan orde satu karena hanya bergantung pada konsentrasi satu senyawa saja. Sementara itu, untuk reaksi SN-2 serangan nukleofilik dan lepasnya *leaving group* terjadi secara bersamaan tanpa melibatkan tahap intermediat antara reaktan dan produk. Pada SN-2,

mengandakan konsentrasi nukleofil dan substrat menyebabkan laju reaksi menjadi dua kali lipat. Oleh karena itu persamaan laju pada SN-2 digambarkan sebagai orde dua karena bergantung pada konsentrasi dua senyawa yang berbeda (Klein, 2015).

## **2.11 Uji Kemurnian**

### **2.11.1 Kromatografi Lapis Tipis**

Uji Kemurnian dapat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dua dimensi dan penentuan jarak lebur. Teknik pemisahan pada kromatografi lapis tipis yaitu dengan menggunakan adsorben (fase diam) pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat alumunium, atau pelat plastik, serta larutan yang berperan sebagai fase gerak. Prinsip kromatografi lapis tipis yaitu pemisahan berdasarkan dengan polaritas. Semakin mirip sifat fisik senyawa dengan fase gerak, maka senyawa tersebut akan semakin lama berada dalam fase gerak. Fase gerak akan membawa senyawa yang paling larut ke atas pelat KLT. Pada umumnya, KLT digunakan untuk mengetahui komponen dalam suatu campuran, identifikasi senyawa, efektifitas pemurnian, serta memantau berjalannya suatu reaksi (Kumar, *et al.*, 2013).

Pemilihan eluen atau pelarut yang cocok merupakan bagian yang paling penting dalam sistem KLT. Pertimbangan dalam memilih eluen biasanya mencakup tiga kriteria sebagai berikut, yakni kelarutan, afinitas, dan resolusi (pemisahan). Eluen atau pelarut dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda. Tujuan dari penggunaan campuran fase gerak ini yaitu untuk

meningkatkan resolusi sampel. Kebanyakan sistem pelarut KLT mengandung pelarut polar dan pelarut kurang polar secara kromatografi. Polaritas pelarut yang akan digunakan untuk kromatografi dapat dievaluasi dengan memeriksa konstanta dielektrik ( $\Sigma$ ) dan momen dipol pelarut. Semakin besar kedua angka ini, maka semakin polar pelarutnya (Wulandari, 2011; Bele & Khale, 2011).

Untuk memilih eluen yang cocok, dapat dilakukan optimasi eluen. Jika fase gerak belum dilaporkan atau ditentukan sebelumnya, dapat dimulai dengan kombinasi yang kurang polar seperti heksana/etil asetat. Jika bercak tetap berada di garis awal pelat, tambahkan lebih banyak pelarut polar. Jika noda yang muncul ( $R_f > 0,8$ ) maka tambahkan lebih banyak pelarut nonpolar atau beralih ke kombinasi yang lebih kurang polar. Substitusi dalam pelarut yang lebih polar sering mengakibatkan perubahan resolusi, sementara perubahan dalam pelarut yang kurang polar menghasilkan perubahan  $R_f$  dari komponen sampel (Cai, 2014).  $R_f$  merupakan jarak lebur yang didapat dari perbandingan jarak tempuh senyawa dari titik asalnya dengan jarak tempuh pelarut (Kumar, *et al.*, 2013).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

### 2.11.2 Uji Melting point

Titik leleh senyawa kimia dapat berfungsi sebagai indikator yang berguna untuk mengetahui identitas dan kemurnian zat. Titik leleh suatu zat merupakan kisaran atau rentang temperatur antara mulai melelehnya kristal pertama dari zat padat dengan kristal terakhir menyelesaikan peleburannya. Rentang titik leleh untuk padatan murni biasanya sangat



sempit (hanya 1-2°C). Sejumlah kecil pengotor yang ada akan menurunkan beberapa derajat titik leleh suatu senyawa dan memperluas rentang suhu titik leleh. Hal ini disebabkan karena pengotor dapat menyebabkan cacat pada kisi kristal, sehingga interaksi antar molekul lebih mudah diatasi. Pada kristal dengan pengotor, lebih sedikit panas yang dibutuhkan untuk melelehkan campuran ini daripada yang dibutuhkan untuk melelehkan kristal murni, sehingga padatan yang tidak murni meleleh pada suhu yang lebih rendah daripada padatan yang murni. Padatan yang tidak murni juga meleleh pada rentang suhu yang lebih luas, karena daerah tiap kristal mengandung jumlah pengotor yang berbeda, dengan demikian jumlah cacat pada kisi kristal pun berbeda (Brittain, 2009; Young, 2013)

## **2.12 Uji Konfirmasi Struktur Obat**

### **2.12.1 Spektrofotometri UV-Vis**

Spektrofotometri UV / VIS adalah teknik yang didasarkan pada penyerapan cahaya oleh zat yang tidak diketahui atau oleh sampel yang tidak diketahui. Di sini, sampel diterangi dengan sinar elektromagnetik dari berbagai panjang gelombang yang terlihat (VIS, yaitu warna yang berbeda) dan rentang yang berdekatan yaitu ultraviolet (UV) dan bagian dari wilayah inframerah bawah (dekat IR) dari spektrum. Penyerapan cahaya tergantung pada substansinya. Sebagian cahaya akan diserap, dipantulkan, dan yang tersisa akan di transmisikan. Kemudian detektor akan mencatat panjang gelombang dan absorbansi dari suatu senyawa. Akibatnya, karena setiap zat menyerap cahaya dengan cara yang berbeda, terdapat hubungan yang unik dan spesifik antara zat tersebut dengan

spektrum UV / VISnya. Spektrum kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi atau mengukur suatu zat (Toledo, 2015).

Absorpsi UV-VIS oleh molekul umumnya terjadi dalam satu atau lebih pita absorpsi elektronik, yang masing-masing terdiri dari banyak garis yang rapat namun terpisah. Setiap garis muncul dari transisi elektron yang tereksitasi dari keadaan dasar ke keadaan yang lebih tinggi (Skoog, *et al.*, 2014). Pada spektrofotometer UV-VIS diperlukan senyawa dengan kandungan kromofor agar dapat mengabsorpsi sinar dengan kuat di daerah UV-Vis, misalnya seperti heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbon monoksida, dan gas nitrogen (Suhartati, 2017).

#### **2.12.2 *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)***

*Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* merupakan metode yang banyak digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dalam material (padat, cair, dan gas), dengan menggunakan pancaran radiasi inframerah (Khan *et al.*, 2018). Instrumen ini mampu mengidentifikasi senyawa organik dan anorganik murni karena hampir semua spesies molekul mampu menyerap radiasi inframerah. Selain itu, tiap senyawa molekul memiliki spektrum absorpsi inframerah yang unik dan berbeda. Energi radiasi inframerah dapat memicu transisi getaran dan rotasi yang bergantung pada jumlah atom dan jumlah ikatan yang dikandungnya. Penyerapan inframerah terjadi tidak hanya dengan molekul organik, tetapi juga dengan kompleks logam yang terikat secara kovalen, yang umumnya aktif di wilayah inframerah dengan panjang gelombang yang lebih panjang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* memiliki sensitivitas tinggi, resolusi, dan kecepatan akuisisi data (data untuk seluruh spektrum dapat

diperoleh dalam 1 detik atau kurang) (Skoog, *et al.*, 2014) Prinsip FTIR yaitu penyerapan radiasi inframerah yang berbeda pada suatu molekul dan diinterpretasikan dalam bentuk pita pada spektrum (Sulistyani, 2017). Ketika molekul diradiasi dengan radiasi elektromagnetik, energi akan diserap jika frekuensi radiasi sesuai dengan frekuensi vibrasinya. Karena setiap frekuensi yang diserap oleh molekul sesuai dengan gerakan molekul tertentu, maka dapat ditemukan jenis gerakan yang dimiliki molekul dengan mengukur spektrum IR-nya. Dengan menafsirkan gerakan ini, kita dapat menentukan jenis ikatan (gugus fungsi) yang ada dalam molekul (McMurry, 2012).

### 2.12.3 Spektrofotometri $^1\text{H}$ -NMR dan $^{13}\text{C}$ -NMR

Spektrofotometri resonansi magnetik inti (NMR) memungkinkan untuk mendeteksi inti atom, sehingga dapat diketahui jumlah dan jenis lingkungan atom dalam suatu molekul, dan mengetahui struktur gugus yang berdekatan dengan atom hydrogen maupun karbon. NMR dapat dengan mudah membedakan jenis hidrogen ( $^1\text{H}$ ) dengan mendeteksi lingkungan tempat inti hidrogen berada. Demikian pula pada karbon ( $^{13}\text{C}$ ) yang dapat dibedakan dengan mudah oleh NMR. Prinsip dari spektrofotometri NMR adalah mendeteksi energi radiasi radiofrekuensi yang diserap terhadap perubahan *nuclear spin state* (Clayden, *et al.*, 2012). Dalam menginterpretasikan spektra  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR perlu diperhatikan luas puncak (*peak area*), pemecahan puncak (*splitting*), dan geseran kimia (*chemical shift*) (Achmadi, 2003). Pergeseran kimia ( $\delta$ ) disebabkan karena frekuensi resonansi yang ditimbulkan setiap inti berbeda. Setiap inti karbon dikelilingi oleh elektron yang melindungi inti

dari bidang yang diterapkan. Elektron yang berlawanan dengan medan magnet akan membentuk *shielding effect* yang menginterpretasikan nilai dari pergeseran kimia. Nilai pergeseran kimia akan semakin tinggi bila elektron semakin *deshielded (low shielded field)*, dan akan semakin rendah bila elektron dalam keadaan semakin *shielded (high shielded field)* (Jenie, *et al.*, 2014). Untuk spektrum  $^1\text{H}$ -NMR hampir sama dengan spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR, namun skala pada  $^1\text{H}$ -NMR jauh lebih kecil yaitu hanya berkisar sampai 10 ppm. Hal ini dapat disebabkan karena adanya kemungkinan perubahan yang lebih kecil dalam dua elektron disekitar inti hidrogen dibandingkan dengan delapan elektron valensi di sekitar inti karbon (Clayden, *et al.*, 2012).

#### 2.12.4 Spektroskopi Massa

Spektroskopi massa merupakan suatu teknik pemisahan dari senyawa organik untuk menganalisis struktur molekul secara kualitatif. Metode yang digunakan adalah metode sederhana yang dapat mengukur massa dan berat suatu molekul. Seringkali, untuk mendapatkan informasi struktural tentang suatu molekul, dilakukan pengukuran massa fragmen yang dihasilkan ketika molekul pecah. Sejumlah kecil sampel diuapkan ke dalam sumber ionisasi yang kemudian ditembakkan oleh aliran elektron berenergi tinggi. Prinsip dari spektrometri massa adalah pemisahan ion sampel berdasarkan rasio massa-muatan. Spektrum massa suatu senyawa biasanya ditampilkan sebagai grafik batang, dengan massa (nilai  $m/z$ ) pada sumbu x dan intensitas, atau kelimpahan relative ion dari  $m/z$  tertentu yang mengenai detektor pada sumbu y. Puncak tertinggi dengan intensitas 100% disebut puncak dasar, dan puncak yang

berhubungan dengan radikal kation tak terfragmentasi disebut puncak induk atau ion molekuler ( $M^+$ ) (McMurry, 2012).

Ketika sebuah elektron berenergi tinggi menyerang sebuah molekul organik, ia akan melepaskan elektron valensi dari molekul, menghasilkan kation radikal, dimana kation karena molekul telah kehilangan sebuah elektron dan sekarang memiliki muatan positif, sedangkan radikal karena molekulnya sekarang memiliki jumlah elektron ganjil. Penembakan elektron mentransfer begitu banyak energi sehingga sebagian besar radikal kation radikal terpecah setelah pembentukan. Mereka pecah menjadi potongan-potongan kecil, beberapa diantaranya mempertahankan muatan positif dan beberapa diantaranya netral. Fragmen tersebut kemudian mengalir melalui pipa melengkung dengan medan magnet yang kuat, yang nantinya akan membelokkannya ke jalur yang berbeda sesuai dengan rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ). Fragmen netral tidak dibelokkan oleh medan magnet dan hilang di dinding pipa, tetapi fragmen dengan muatan positif akan disortir oleh spektrometri massa ke detektor, yang kemudian merekamnya sebagai puncak pada berbagai rasio  $m/z$  (McMurry, 2012).

## **2.15 Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Vitro***

Teknik yang paling populer digunakan untuk penilaian aktivitas antimikroba adalah metode difusi agar (difusi cakram atau difusi sumur) dan metode dilusi (dilusi agar dan dilusi cair (makro/mikrodilusi) (Golus *et al.*, 2016). Tujuan dari kedua metode ini adalah untuk menentukan

konsentrasi terendah dari antimikroba yang diuji sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang diujikan (Kadar Hambat Minimum, biasanya dinyatakan dalam  $\mu\text{g/mL}$  atau  $\text{mg/liter}$  atau ppm). Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (World Organisation of Animal Health, 2012).

### 2.15.1 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah metode yang paling tepat untuk penentuan nilai KHM, karena metode ini dapat memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media (makrodilusi atau mikrodilusi). Baik metode *broth* atau metode *solid dilution test* dapat digunakan mengukur aktivitas antimikroba *in vitro* secara kuantitatif terhadap bakteri (Balouiri, *et al.*, 2016).

#### 2.15.1.1 Metode Dilusi Cair (*Broth Dilution*)

Dilusi cair adalah suatu teknik yang mana suspensi bakteri telah ditentukan konsentrasi optimal sebelumnya yang kemudian diuji dengan berbagai konsentrasi dari agen antimikroba (biasanya digunakan serial pengenceran dua kali lipat). Jumlah inokulum bakteri akhir yang direkomendasikan untuk dilusi cair adalah  $5 \times 10^5$  CFU/ml (Wiegand, *et al.*, 2008). Metode dilusi cair dapat dilakukan dalam tabung bersisi volume minimal 2 mL (makrodilusi) atau dalam volume yang lebih kecil dengan menggunakan pelat mikrotitrasi (mikrodilusi). Metode makrodilusi memiliki kelemahan utama yaitu membosankan karena pekerjaan dilakukan secara manual dan risiko terjadi kesalahan dalam persiapan larutan antimikroba serta jumlah reagen untuk setiap pengujian, sementara itu, metode mikrodilusi dinilai kurang fleksibel dibandingkan dengan dilusi agar atau

difusi cakram karena sebagian besar panel uji antimikroba mikrodilusi cair masih memiliki harga yang tinggi (World Organisation of Animal Health, 2012).

#### **2.15.1.2 Metode Dilusi Agar**

Menurut Chikezie (2017) dilusi agar merupakan salah satu metode yang sangat berguna dalam menentukan nilai kadar hambat minimum (KHM). Penentuan KHM pada metode dilusi melibatkan indikator bakteri ke dalam berbagai konsentrasi antibiotik yang dilarutkan pada media agar dan di inkubasi selama 18 sampai 24 jam. Interpretasi yang dihasilkan pada metode ini adalah evaluasi potensi antibakteri pada senyawa baru yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi terendah sebagai data kuantitatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada *plate* (Chikezie, 2017). Selain itu, KHM dapat digunakan untuk memantau perkembangan resistensi bakteri terhadap suatu antibakteri. Media yang biasa digunakan dalam menentukan KHM yakni *Mueller-Hinton agar* (MHA). Dikatakan pula bahwa keuntungan dalam penentuan KHM dengan metode dilusi agar adalah dapat menguji kerentanan bakteri secara bersamaan dalam satu cawan dan dierkomendasikan pada bakteri yang tumbuh secara aerob (Wiegand *et al.*, 2008). Sementara itu, kelemahan dari metode dilusi agar ini adalah pengerjaannya cukup melelahkan jika dilakukan secara manual dan *plate* yang telah disiapkan hanya dapat digunakan selama seminggu (atau kurang dari seminggu tergantung pada uji antimikroba) (World Organisation of Animal Health, 2012).

Prosedur metode dilusi agar yang dituliskan oleh Jiang (2011) secara umum dibagi menjadi 4 tahap yakni pengambilan koloni bakteri,

pembuatan suspensi, pembakuan suspensi dan inokulasi media agar. Metode tersebut melibatkan pengenceran dua kali senyawa uji sebagai agen yang bersifat antibakteri dengan suhu 45°C menggunakan plat MHA dengan pH 5.9 (Jiang, 2011). Setelah itu, dilakukan pencampuran antara larutan senyawa uji antimikroba yang sudah diencerkan ke dalam agar yang masih cair dan diamkan hingga mengeras. Agar yang telah mengeras ditetesi dengan bakteri dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/spot lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Wiegand, *et al.*, 2008).

### **2.15.2 Metode Difusi**

Metode lain yang digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba adalah dengan metode difusi. Metode difusi terdiri dari tiga teknik pengerjaan, yaitu difusi cakram, difusi sumuran, dan *E-test*.

#### **2.15.2.1 Difusi Cakram**

Difusi cakram merupakan metode difusi menggunakan cakram kertas yang telah disemai dengan antimikroba konsentrasi tertentu. Cakram kertas kemudian dimasukan ke dalam media kultur padat yang telah ditanami dengan inokulum yang akan diuji secara merata. Difusi cakram didasarkan pada penentuan zona hambat yang sebanding dengan kerentanan bakteri terhadap antimikroba yang ada di cakram. Difusi agen antimikroba menghasilkan gradien hambatan pada media kultur. Ketika konsentrasi dari antimikroba menjadi sangat encer sehingga tidak dapat lagi menghambat pertumbuhan bakteri uji, maka zona hambat dibatasi. Diameter zona hambatan di sekitar cakram antimikroba berkaitan dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) untuk kombinasi bakteri/antimikroba tertentu. Semakin besar zona hambatnya, maka semakin rendah



konsentrasi antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan organisme. Difusi cakram mudah dilakukan, akurat, dan tidak membutuhkan peralatan yang mahal. Keuntungan utamanya adalah biaya rendah, mudah dalam memodifikasi uji cakram antimikroba bila diperlukan, dapat digunakan sebagai uji skrining terhadap sejumlah besar isolat, serta dapat mengidentifikasi subset dari isolat untuk pengujian lebih lanjut dengan metode lain, seperti penentuan KHM. Cakram harus didistribusikan secara merata sehingga zona hambatan di sekitar cakram tidak tumpang tindih (World Organisation of Animal Health, 2012).

#### **2.15.2.2 Difusi Sumuran**

Metode difusi sumuran banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba tanaman atau ekstrak mikroba. Prosedur difusi sumuran hampir sama dengan metode difusi cakram. Permukaan pelat agar diinokulasi dengan meratakan volume okulum mikroba di seluruh permukaan agar. Dibuat lubang sumuran dengan diameter 6-8 mm secara aseptik dengan bor gabus steril atau dengan tip. Setelah itu, sejumlah (20-100 mL) agen antimikroba pada konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam sumur. Kemudian pelat agar diinkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Agen antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain mikroba yang diuji (Balouiri, *et al.*, 2016). Metode ini memiliki kelebihan yaitu pengukuran luas zona hambat menjadi lebih mudah karena dalam metode ini isolat beraktivitas tidak hanya di permukaan agar, tetapi juga sampai bawah. Sementara itu, kelemahan dari metode ini yaitu rentan terjadi kontaminasi pada media saat proses pembuatan lubang. Selain itu, kontaminasi juga

dapat terjadi ketika memasukan sampel ke dalam sumur, hal ini dikarenakan pada kegiatan ini sering membuka cawan dari pada metode difusi lain, sehingga kemungkinan terjadi kontaminasi sangat tinggi (Retnaningsih, *et al.*, 2019).

#### **2.15.2.3 *E-Test***

Metode *E-test* menggabungkan prinsip metode pengenceran dari metode dilusi dengan metode difusi untuk menentukan nilai KHM. Hal ini memungkinkan terbentuknya gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar. Dalam prosedur, strip diresapi dengan peningkatan gradien konsentrasi dari agen antimikroba dari satu ujung ke ujung lainnya kemudian diendapkan pada permukaan agar yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Metode ini digunakan untuk penentuan KHM antimikroba, yang mana nilai KHM ditentukan pada perpotongan dari strip dan elips penghambatan pertumbuhan. *E-test* sangat sederhana untuk diterapkan namun mengeluarkan biaya yang cukup besar, sehingga bila *E-test* digunakan pada pengujian banyak obat, maka biaya yang dikeluarkan pun akan semakin besar (Balouiri, *et al.*, 2016).

*E-test* dapat dilakukan untuk menyelidiki interaksi antimikroba antara dua obat. Untuk mempelajari interaksi dari dua antibiotik, strip *Etest* diresapi dengan antibiotik pertama, kemudian ditempatkan pada permukaan piring agar yang telah diinokulasi sebelumnya. Setelah satu jam, strip diangkat dan diganti dengan yang lain kemudian diresapi dengan antibiotik kedua. Efek sinergi dideteksi dengan penurunan KHM dari

kombinasi setidaknya dua pengenceran yang dibandingkan dengan antibiotik paling aktif yang diuji sendiri (Balouiri, *et al.*, 2016).

## **2.16 Scoring (Semi-Quantitative)**

Skoring semi-kuantitatif ditetapkan oleh pengamat atau peneliti berdasarkan kriteria morfologi yang telah ditentukan. Skor semi-kuantitatif dapat diterapkan pada perubahan dalam suatu organisme secara makroskopis ataupun mikroskopis, serta memungkinkan pembuatan data yang kuat yang dapat digunakan untuk analisis statistik dan evaluasi kelompok eksperimen. Integrasi penskoran semi-kuantitatif dalam penelitian translasi dapat berguna dalam beberapa situasi. Pertama, data penskoran semi-kuantitatif relatif murah, karena tidak diperlukan perangkat lunak atau alat komputasi. Kedua, ini bisa menjadi metode penyaringan data yang cepat untuk memandu studi penelitian masa depan. Ketiga, data semi-kuantitatif dapat meningkatkan ketelitian teks deskriptif. Terakhir, data semi-kuantitatif dapat digunakan untuk memandu, menguatkan, dan memvalidasi pengamatan atau data yang diperoleh dari pengujian lain. Namun, jika dibandingkan dengan metode kuantitatif, skor semi-kuantitatif masih terbilang kurang tepat karena mendekati perubahan relatif (Meyerholz & Beck, 2018).

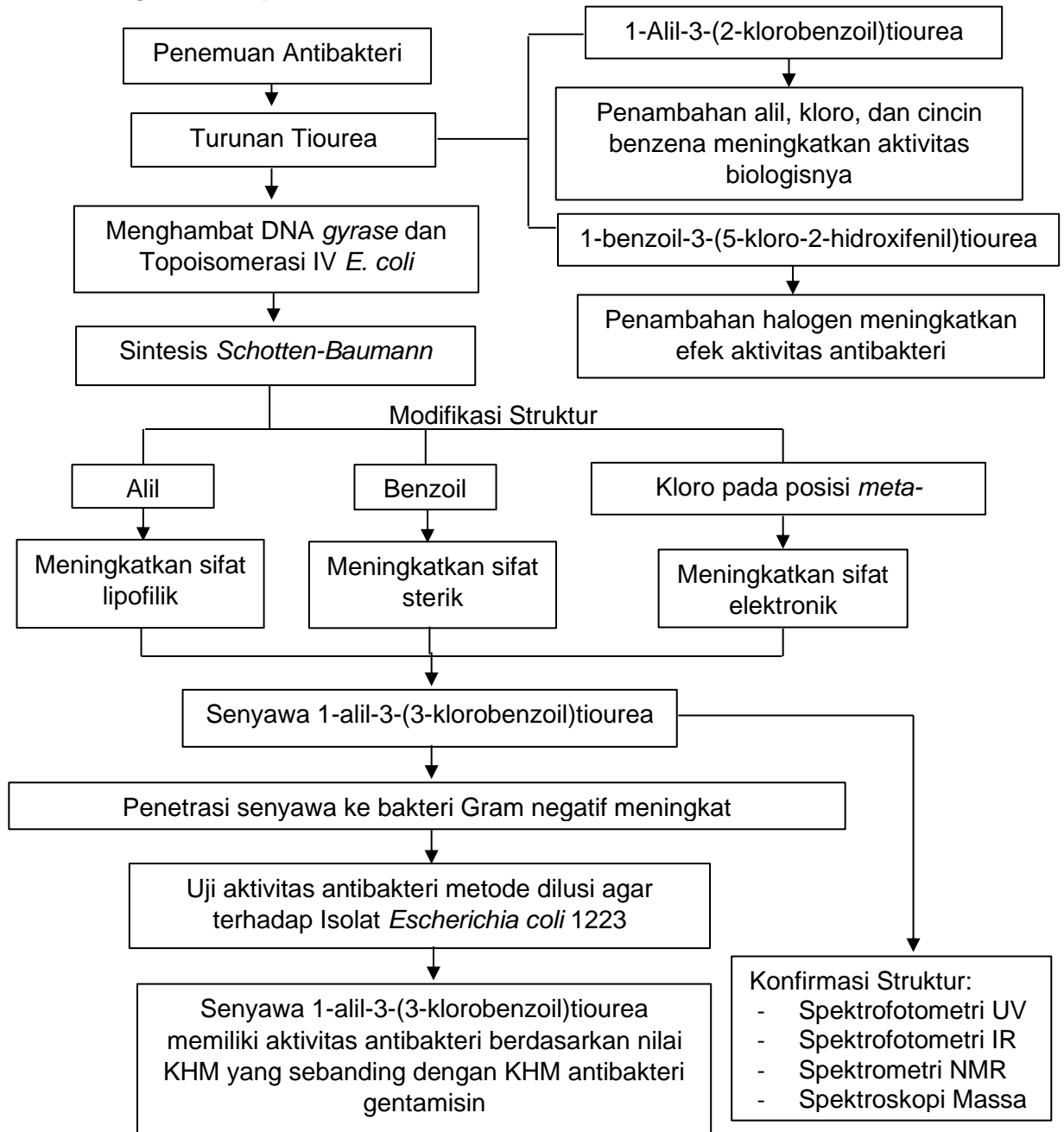
Dalam beberapa bidang ilmiah, data dapat diperoleh menggunakan skor semi-kuantitatif. Skor semi-kuantitatif dapat digunakan pada bidang praklinis yang menggunakan model (seperti hewan, kultur jaringan/sel, dan lainnya) dari penyakit atau kondisi manusia dengan membandingkan kelompok eksperimen. Sementara itu,

pada bidang klinis, skor semi-kuantitatif jaringan manusia (misalnya, kanker, kultur jaringan/sel, dan lainnya) sering digunakan untuk membantu menentukan diagnosis penyakit, patogenesis, biomarker, dan prognosis klinis (Meyerholz & Beck, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Hashimoto & Shime (2013) ditemukan korelasi yang signifikan antara perwarnaan Gram semi-kuantitatif atau hasil kultur dengan hasil kultur kuantitatif, dengan skor yang digunakan yakni 0, +1, +2, +3, dan +4.

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Pada kerangka konsep yang telah dibuat, untuk mengembangkan obat baru yang memiliki efek antibakteri dapat digunakan turunan tiourea sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) (Arslan *et al.*, 2009). Turunan tiourea diketahui memiliki potensi sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat *DNA gyrase* dan *Topoisomerase IV* pada sel bakteri *E. coli* (Hashem, *et al.*, 2020). Tak hanya itu, modifikasi struktur yang dilakukan pada turunan tiourea dapat meningkatkan efek biologis dari senyawa tersebut. Hal ini didukung dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Shalas *et al.* (2016) dan Atiş *et al.* (2012). Pada penelitian yang dilakukan Shalas *et al.* (2016), telah dibuktikan bahwa turunan tiourea yang dimodifikasi strukturnya dengan penambahan alil, kloro, dan juga cincin benzena menjadi 1-alil-3-(2-klorobenzoil)tiourea dapat meningkatkan aktivitas biologis dari senyawa turunan tiourea. Sementara itu, Atiş *et al.* (2012) menyatakan bahwa turunan tiourea yaitu 1-benzoil-3-(5-kloro-2-hidroksifenil)tiourea dengan penambahan halogen dapat meningkatkan efek aktivitas antibakterinya. Maka dari itu, pada penelitian ini dilakukan sintesis menggunakan metode modifikasi *Schotten-Baumann* untuk mendapatkan senyawa baru yang telah dimodifikasi strukturnya. Modifikasi struktur yang dilakukan mengakibatkan terjadinya peningkatan aktivitas biologis yang dipengaruhi oleh sifat lipofilik, elektronik, dan juga sterik (Siswandono & Soekardjo, 2000).

Sifat lipofilik dapat meningkat dengan melakukan penambahan alil pada senyawa turunan tiourea. Perubahan rantai alkil dengan melakukan penambahan alil dapat mempengaruhi interaksi hidrofobik pada senyawa, sehingga dapat meningkatkan sifat lipofilik dari senyawa. Selain itu, penambahan benzoil yang merupakan hidrokarbon aromatis dapat mengubah sifat sterik suatu senyawa

dikarenakan adanya isomer posisi yang dapat mendistribusikan elektron dan mempengaruhi penempatan spasial pada sistem cincin (Shalas, *et al*, 2018). Selanjutnya, penambahan halogen pada posisi *meta*- memberikan peningkatan efek elektronik pada senyawa. Adanya halogen yang merupakan gugus penarik elektron yang kuat dapat meningkatkan efek elektronik dari senyawa. Selain itu, posisi *meta*- di cincin aromatis memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan halogen yang berada diposisi *orto*-, sehingga penempatan halogen pada posisi *meta*- dirasa sudah tepat. Sifat lipofilitas pada gugus *meta*- juga mendukung aktivitas biologis terhadap bakteri, terutama bakteri Gram negatif (Malik *et al.*, 2012).

Dari proses sintesis yang dilakukan, terbentuk senyawa baru yakni senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang dikonfirmasi strukturnya menggunakan 4 macam instrumen, diantaranya spektrofotometri UV, spektrofotometri IR, spektrometri NMR, dan spektroskopi massa. Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea telah memiliki peningkatan pada sifat lipofilik, elektronik, dan sterik sehingga meningkatkan kemampuan senyawa untuk berpenetrasi pada bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel yang kaya akan lipopolisakarida (LPS) dan sedikit peptidoglikan. Adanya LPS pada bakteri Gram negatif memudahkan antibakteri yang memiliki lipofilisitas yang baik untuk menembus dinding sel bakteri Gram negatif (Martinez de Tejada *et al.*, 2012).

Untuk memastikan aktivitas antibakterinya, senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea diuji pada isolat *Escherichia coli* 1223 menggunakan metode dilusi agar. Metode dilusi agar dinilai cocok dan tepat untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM) senyawa uji yang berbentuk suspensi. Oleh sebab itu,

metode ini dipilih dengan harapan nilai KHM dari senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzol)tiourea dapat ditentukan dan dibandingkan dengan KHM pada antibakteri gentamisin yang berperan sebagai senyawa pembanding (Golus, *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, telah dibuktikan bahwa turunan tiourea memiliki efek antibakteri yang baik. Oleh karena itu pada penelitian ini, dilakukan modifikasi struktur dengan cara melakukan sintesis menggunakan metode *Schotten-Baumann* yang telah dimodifikasi. Tujuan dilakukannya modifikasi struktur ialah agar efek antibakteri yang dihasilkan optimal. Modifikasi struktur yang dilakukan pada senyawa ini yaitu dengan melakukan penambahan alil, benzoil, dan kloro pada posisi meta sehingga didapatkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea. Setelah itu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi agar untuk membuktikan aktivitas biologis dari senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

- 3.2.1 Terdapat hubungan antara konsentrasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan efek biologisnya sebagai antibakteri terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223 berdasarkan derajat pertumbuhan koloni.
- 3.2.2 Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki nilai KHM yang sebanding dengan KHM antibiotik gentamisin terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223.



## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksploratif untuk memperoleh senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan metode *Schotten-Bauman*, yang selanjutnya disebut dengan BATU-3. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris dengan melakukan sintesis, dan uji aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea pada isolat urin *Escherichia coli* 1223.

#### **4.2 Subjek Penelitian**

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat uri *Escherichia coli* 1223 yang diperoleh dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang didapatkan dari hasil sintesis. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali.

#### **4.3 Jumlah Pengulangan**

Penelitian ini menggunakan 8 kelompok perlakuan berdasarkan 8 macam konsentrasi senyawa 1-alil-3(3-klorobenzoil)tiourea (BATU-3). Pada penelitian ini dilakukan pengulangan yang dihitung berdasarkan rumus *Federer* sebagai berikut:

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 3$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan, maka pengulangan dalam penelitian ini sebanyak 3 kali. Pengulangan ini dilakukan pada kelompok perlakuan dengan 8 macam konsentrasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea (BATU-3), 5 macam konsentrasi senyawa pembanding (gentamisin) dan 1 kontrol bakteri (Tween 80 0,4%).

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari dua bagian yaitu :

- Variabel bebas : Dosis senyawa uji
- Variabel terikat : Derajat pertumbuhan koloni bakteri menggunakan *scoring*

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian sintesis 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dilakukan di Laboratorium Farmasi, Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan untuk uji konfirmasi struktur senyawa dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga Surabaya Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September 2019 hingga bulan Februari 2021.

#### 4.6 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Bahan

Aliltiourea (*sigma aldrich*); 3-klorobenzoil klorida (*sigma aldrich*); tetrahidrofuran (*sigma aldrich*); etil asetat (*MERCK*); metanol (*MERCK*); n-heksana (*MERCK*); trietilamin (*sigma aldrich*); kloroform (*MERCK*); natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (*MERCK*); aquadest; media *Mueller Hilton Broth* (*MERCK*); media *MacConkey Agar* (*MERCK*); media *Eosin Methylene Blue*; DMSO (*MERCK*); isolat urin *Escherichia coli* 1223; Mc. Farland; Tween-80 teknis; *Water for Injection* (WFI) dan aquadest steril; bahan pewarnaan Gram terdiri dari lugol, kristal violet, safranin, dan alcohol 96%; minyak imersi; dan antibiotik Gentamisin Sulfat Injeksi 40 mg/mL (*Sagestam*).

##### 4.6.2 Alat

Satu set peralatan refluks (*Pyrex*), corong pisah (*Pyrex*), icebath, timbangan analitik (PA224 OHAUS), pengaduk magnetik dengan *Hotplate*

(IKA C-Mag HS7), seperangkat alat KLT yaitu lempeng KLT (silica GF<sub>245nm</sub>) dan chamber (Camag); Spektrofotometer UV (Shimadzu UV-Vis 1800); Spektrofotometer FTIR (8400S/Shimadzu); Spektrofotometer NMR (NMR Jeol ICS 400 MHz); Spektrometer GC/MS (Shimadzu GCMA QP2010 Plus); Rotatory Evaporator; Spuit injeksi 1 ml, alat-alat gelas (Pyrex), kulkas, oven, mortir, stamper; plate steril; ose steril dan bunsen burner serta korek api; inkubator; autoklaf; mikroskop; object glass dan kaca penutup; cawan petri (Pyrex); kertas saring; mikropipet (Socorex Acura 285); tabung reaksi (Pyrex); Falcon; kertas pengisap dan tisu.

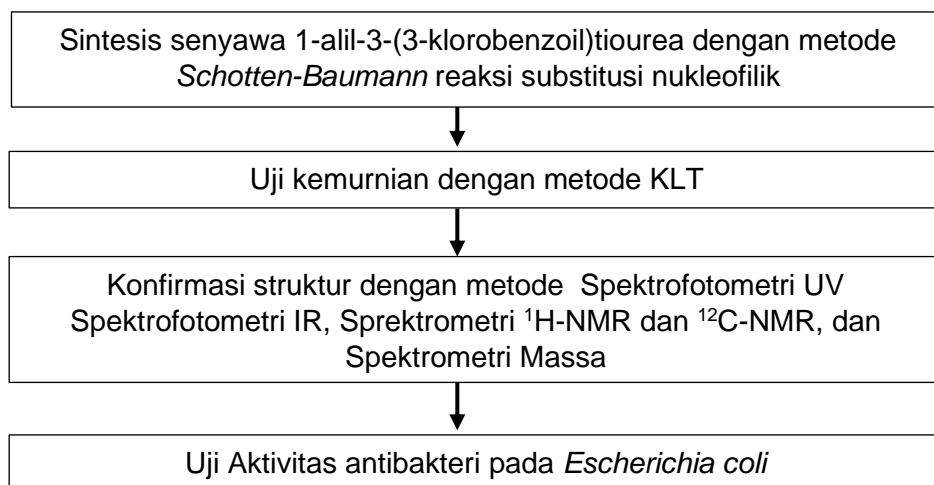
#### 4.7 Definisi Istilah / Operasional

- 1) Sampel uji BATU-3 yang merupakan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang dicampurkan dengan Tween 80 0,4%. Tween 80 0,4% digunakan sebagai *suspending agent* untuk meningkatkan kelarutan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang sukar larut dalam air (pelarut organik).
- 2) Bakteri *Escherichia coli* Isolat 1223 adalah bakteri yang diperoleh dari urin pasien ISK milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- 3) Senyawa pembanding pada uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antibiotik gentamisin dengan nilai kadar hambat minimum (KHM) terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223 pada penelitian ini yaitu 2 ppm.
- 4) Kontrol bakteri pada uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Tween 80 0,4%.

5) Penilaian pertumbuhan koloni bakteri dilakukan berdasarkan sistem skoring sebagai berikut:

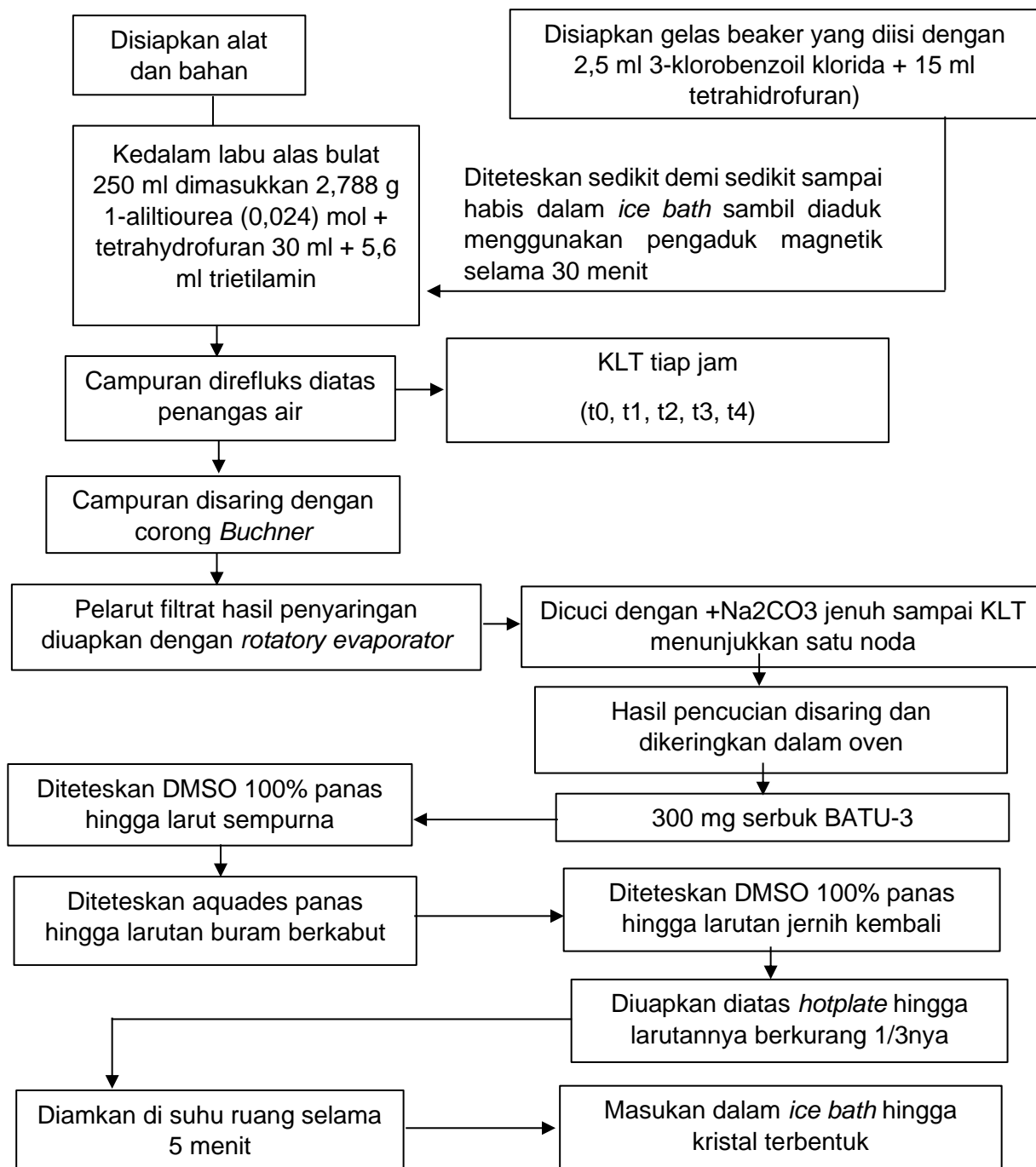
- Skor 0 = Tidak ada pertumbuhan pada media agar
- Skor 1 = Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan rendah
- Skor 2 = Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan sedang
- Skor 3 = Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan tinggi

#### 4.8 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data



**Gambar 4.1 Prosedur Penelitian**

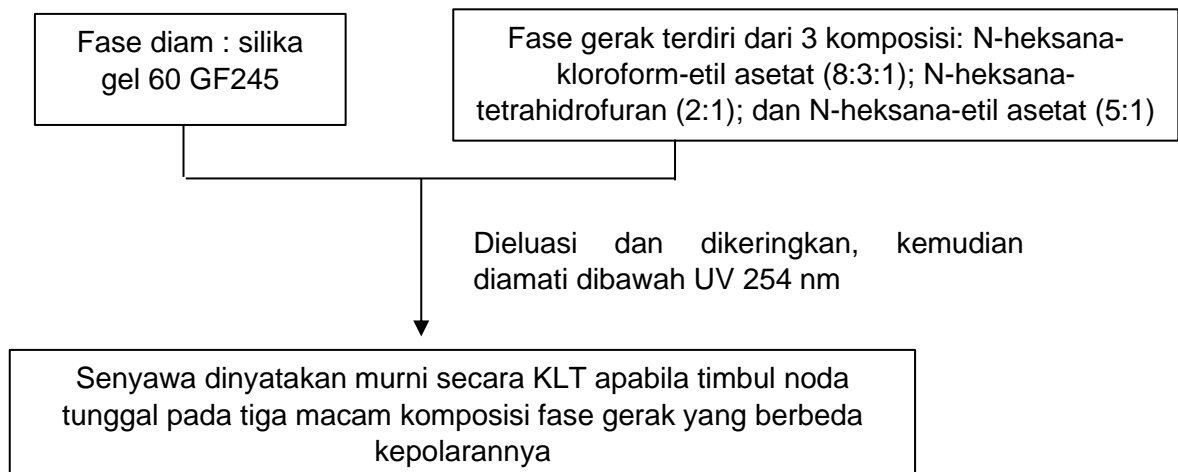
#### 4.8.1 Sintesis Senyawa



Gambar 4. 2 Prosedur Sintesis Senyawa 1-allyl-3-(3-klorobenzoil)thiourea

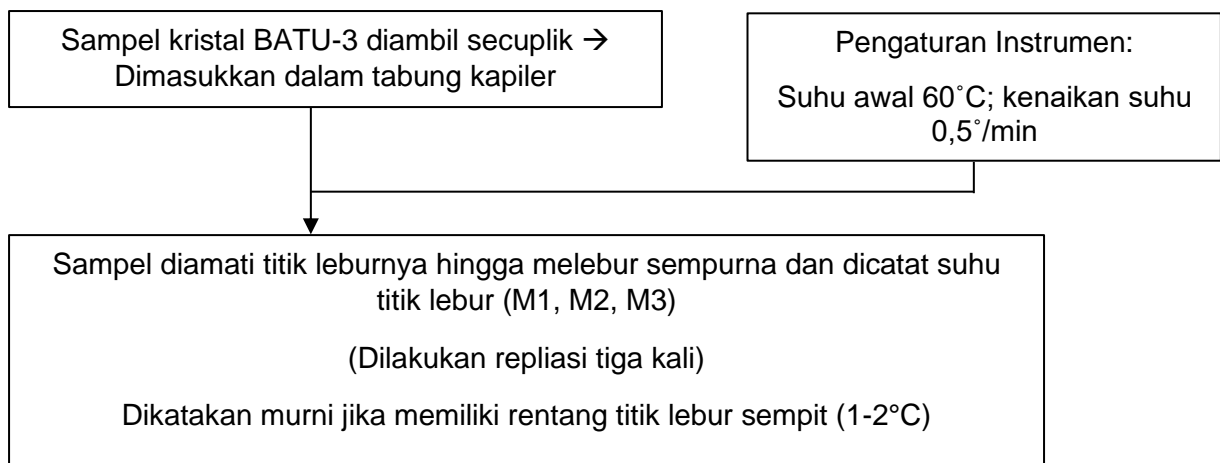
## 4.8.2 Uji Kemurnian

### 4.8.2.1 Uji KLT



**Gambar 4.3 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT**

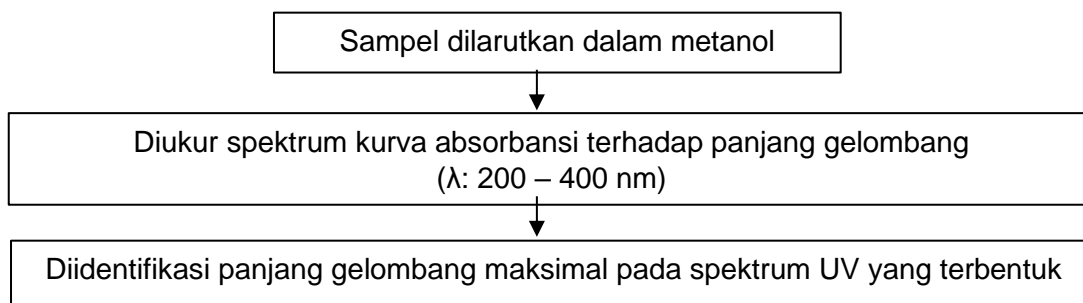
### 4.8.2.2 Uji Rentang Titik Lebur



**Gambar 4.4 Prosedur Uji Kemurnian dengan Melting Point**

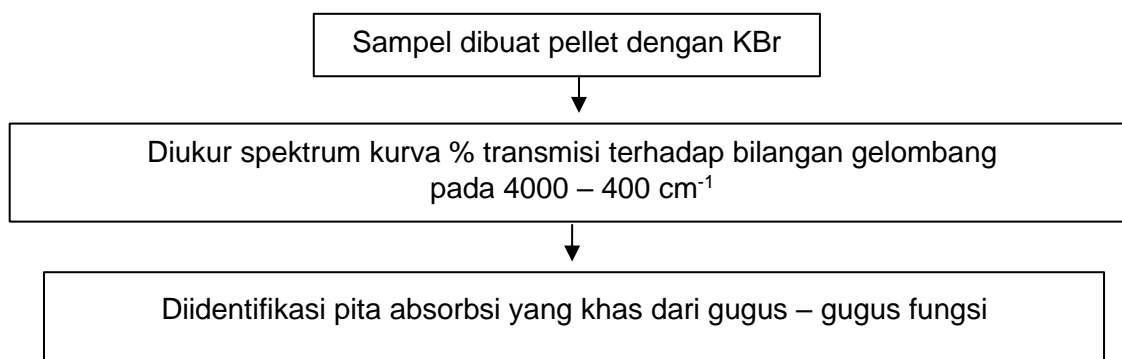
### 4.8.3 Uji Konfirmasi Struktur

#### 4.8.3.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV



**Gambar 4.5 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV**

#### 4.8.3.2 Uji Konfirmasi struktur dengan Spektrofotometer IR

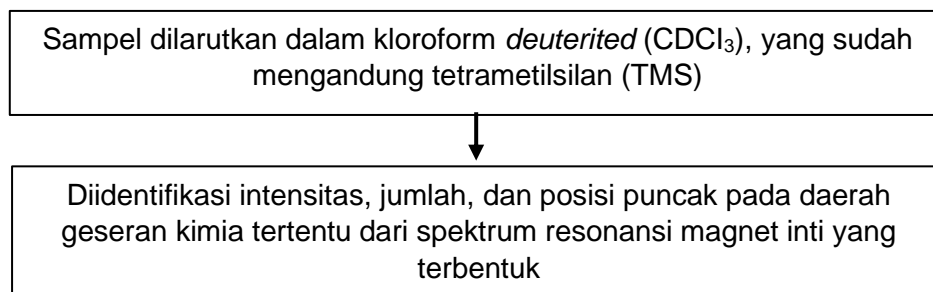


**Gambar 4.6 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR**



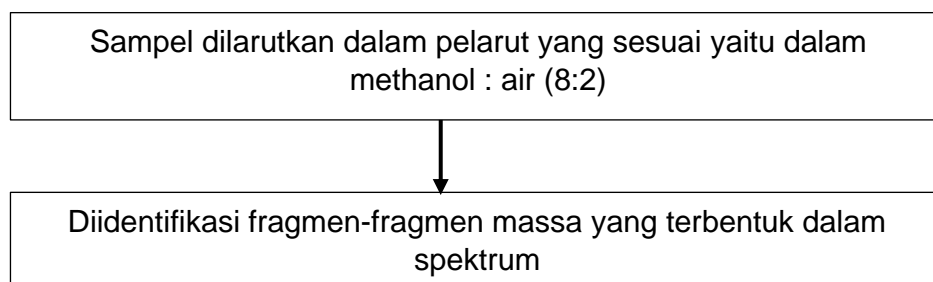
#### 4.8.3.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri NMR

( $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{12}\text{C}$ -NMR)



**Gambar 4.7 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Magnit inti**

#### 4.8.3.4 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektroskopi Massa (ESI)



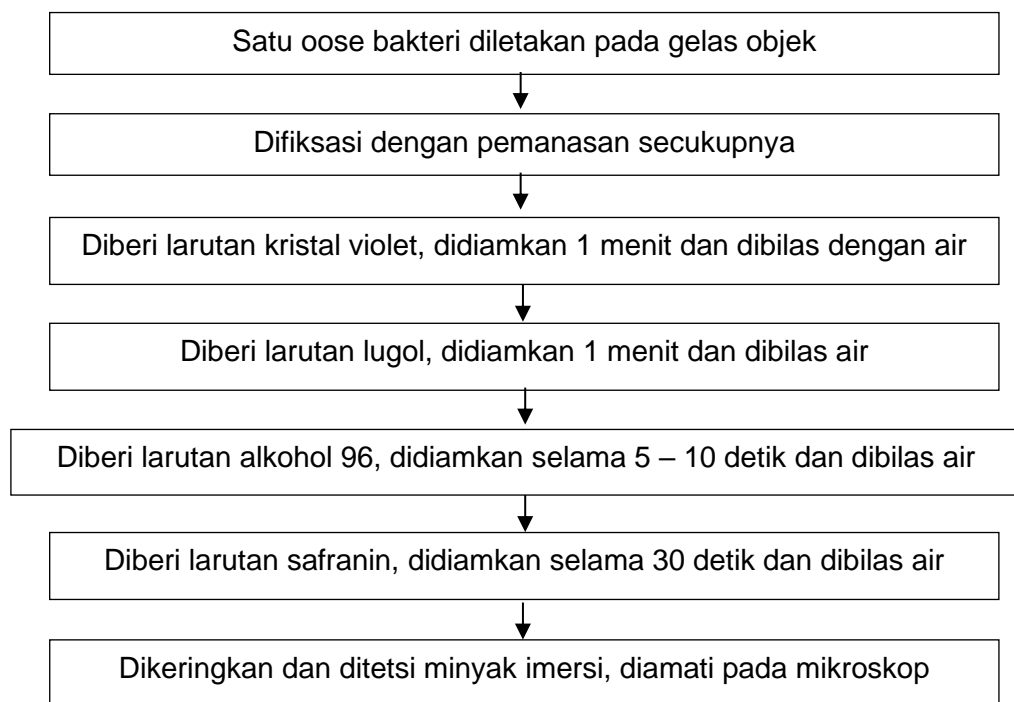
**Gambar 4.8 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa**

#### 4.8.4 Uji Bakteri dengan Mengukur Kadar Hambat Minimum (Metode Dilusi Agar)

##### 4.8.4.1 Identifikasi Bakteri

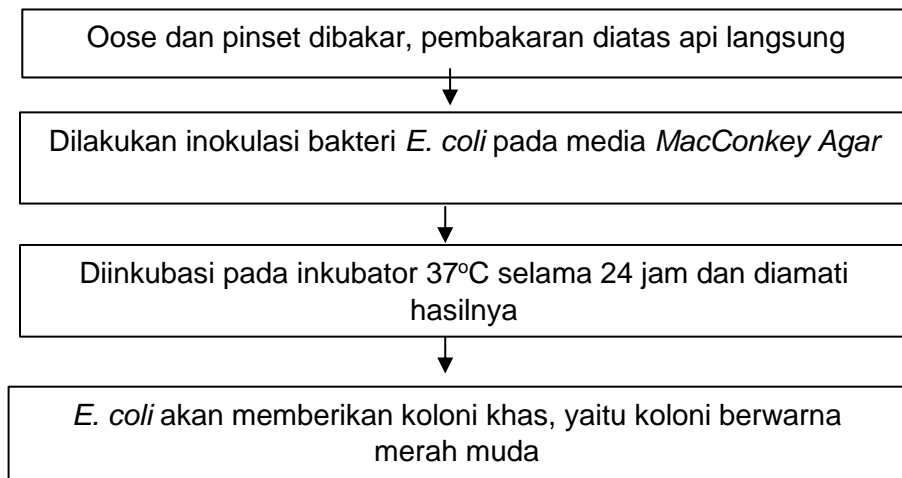
Pemurnian bakteri dilakukan terlebih dahulu dengan menanam bakteri *Escherichia coli* pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) diinkubasi dalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C.

##### 4.8.4.1.1 Pewarnaan Gram



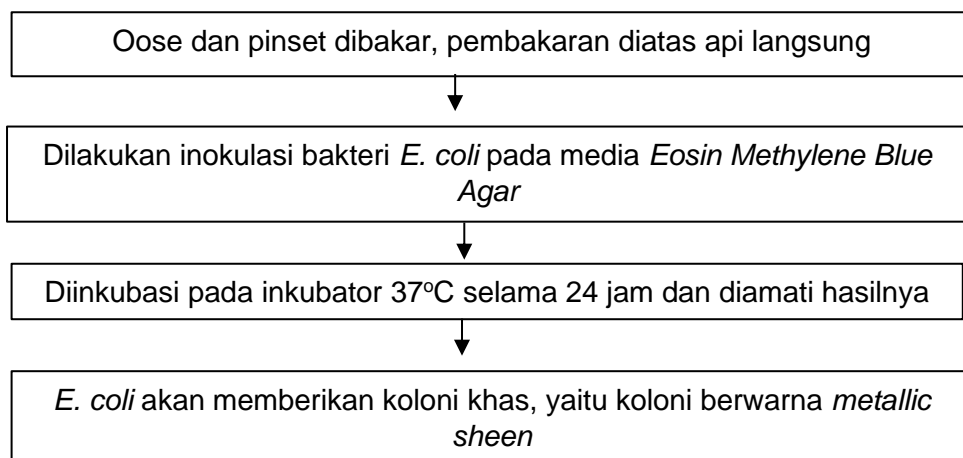
**Gambar 4.9 Prosedur Pewarnaan Gram**

#### 4.8.4.1.2 Kultur Isolat Bakteri pada Media *MacConkey Agar*



**Gambar 4.10** Prosedur Kultur Isolat Bakteri pada media *MacConkey Agar*

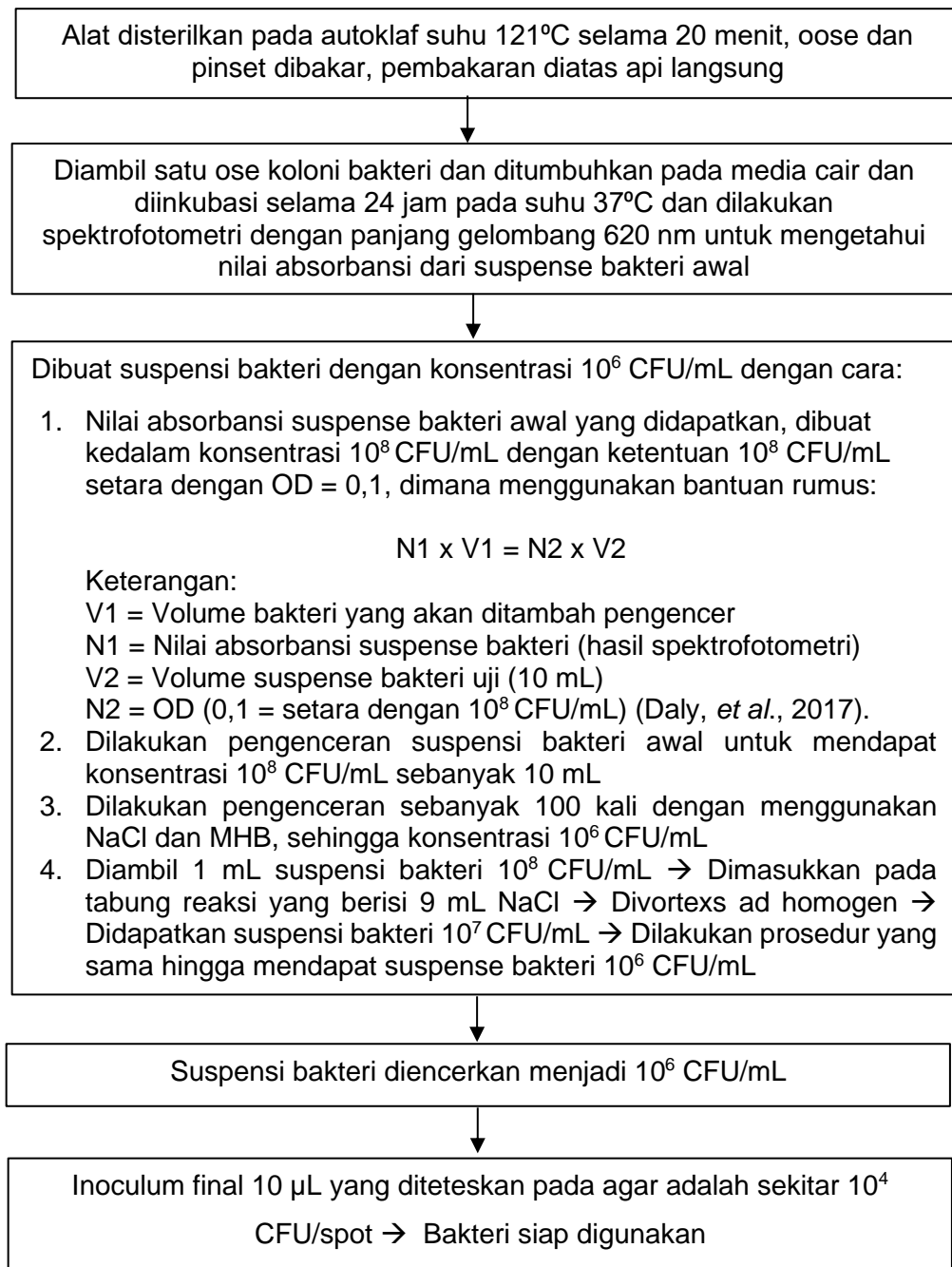
#### 4.8.4.1.3 Kultur Isolat Bakteri pada Media *Eosin Methylene Blue Agar*



**Gambar 4.11** Prosedur Kultur Isolat Bakteri pada media *Eosin Methylene Blue Agar*

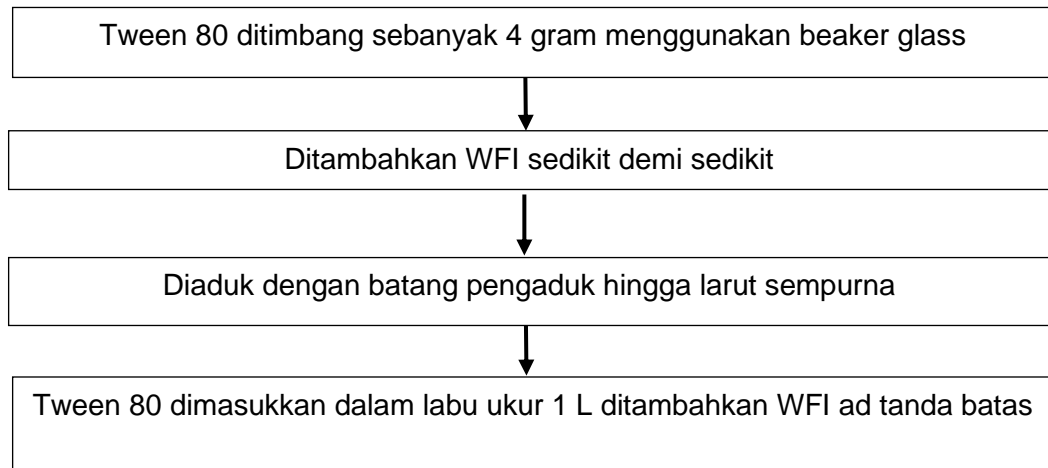
#### 4.8.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri

##### 4.8.4.2.1 Preparasi Kultur Bakteri



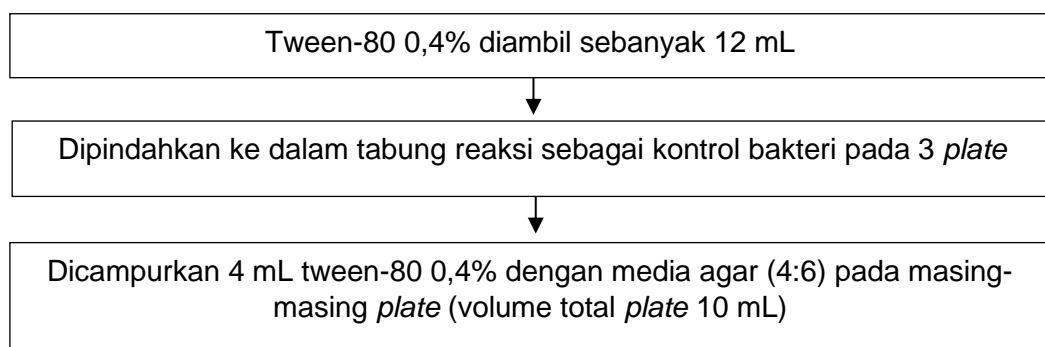
**Gambar 4.12 Prosedur Preparasi Kultur Bakteri**

#### 4.8.4.2.2 Preparasi *Suspending Agent* Tween 80 0.4%



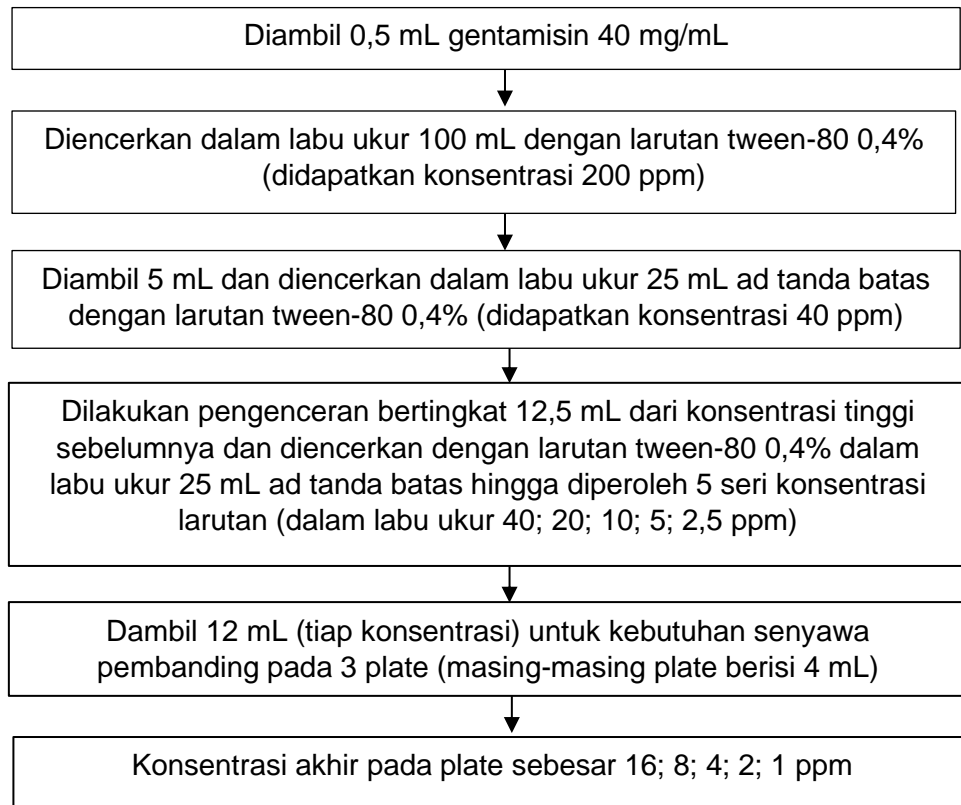
**Gambar 4.13** Prosedur Preparasi *Suspending Agent* Tween 80 0.4%

#### 4.8.4.2.3 Preparasi Kontrol Bakteri (Larutan Tween-80 0,4%)



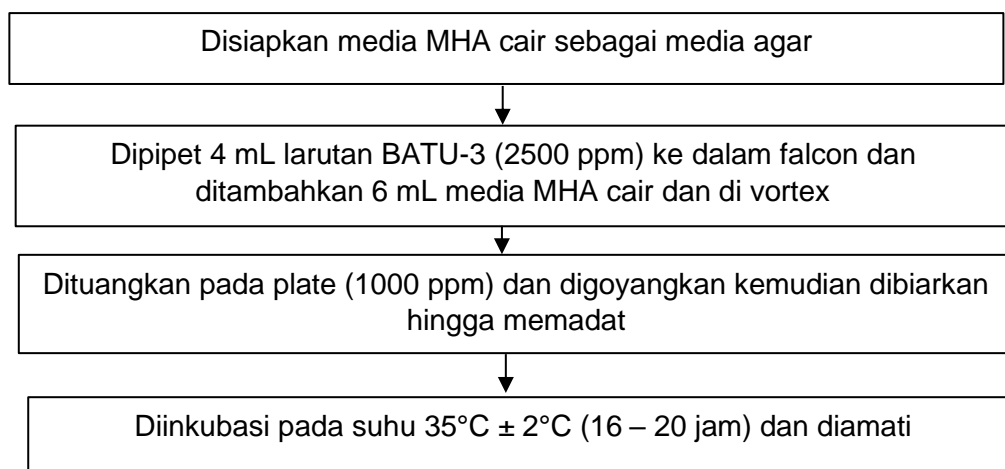
**Gambar 4.14** Prosedur Preparasi Kontrol Bakteri

#### 4.8.4.2.4 Preparasi Senyawa Pembanding (Larutan Gentamisin)



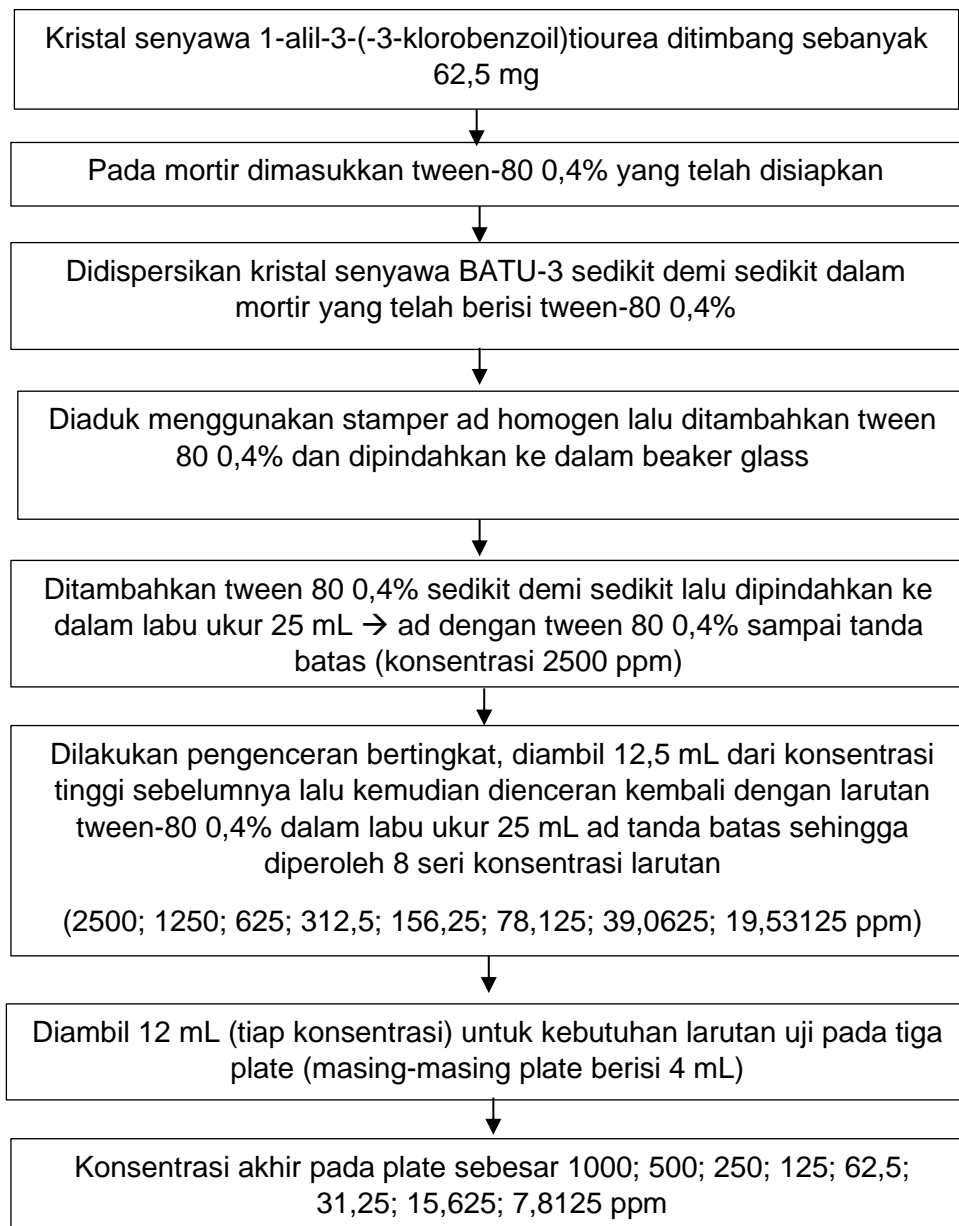
**Gambar 4.15 Preparasi Senyawa Pembanding**

#### 4.8.4.2.5 Preparasi Suspensi Kontrol BATU-3



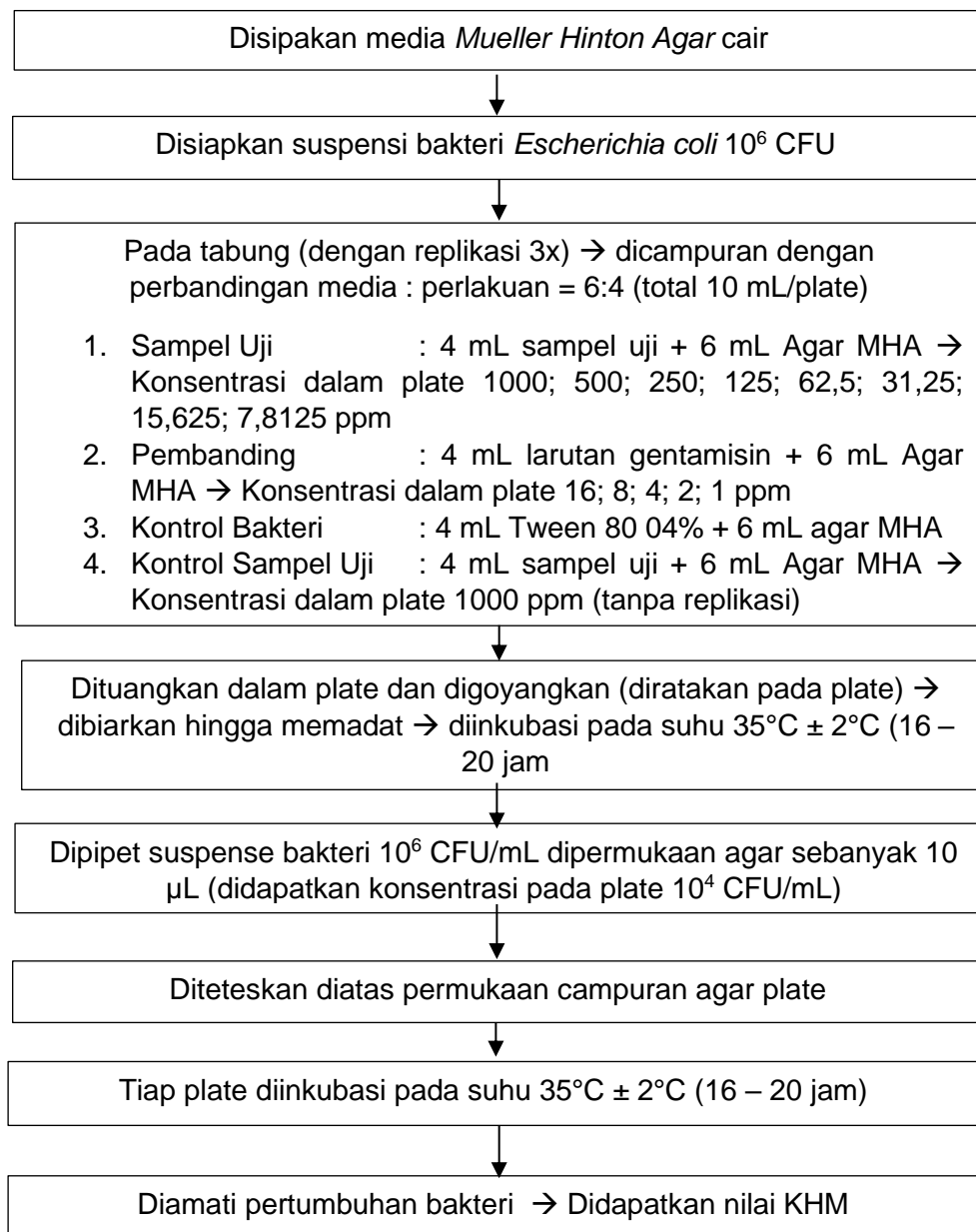
**Gambar 4.16 Preparasi Suspensi Kontrol BATU-3**

#### 4.8.4.2.6 Preparasi Suspensi Uji BATU-3



**Gambar 4.17 Preparasi Suspensi Uji BATU-3**

#### 4.8.4.2.7 Uji Aktivitas Antibakteri (Metode Dilusi Agar)



**Gambar 4.18 Uji Aktivitas Antibakteri (Metode Dilusi Agar)**



#### 4.9 Analisis Data

Proses pengambilan data dilakukan setelah melakukan sintesis dan uji aktivitas antibakteri. Produk sintesis yang dihasilkan dapat dihitung rendemennya menggunakan rumus:

$$\%Rendemen\ Kristal = \frac{Massa\ kristal\ yang\ terbentuk}{Massa\ serbuk\ yang\ ditimbang} \times 100\%$$

Sementara itu, pada uji aktivitas antibakteri dilakukan pengambilan data berupa nilai kadar hambat minimum (KHM) dan penentuan derajat pertumbuhan koloni bakteri yang diinterpretasikan secara *scoring* (semi-kuantitatif). Nilai KHM merupakan konsentrasi terendah dari senyawa uji yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang diperoleh dari dilusi agar. Sebelum melakukan pengujian pada hipotesis, dilakukan analisis normalitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan sampel yang digunakan  $\leq 50$ . Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk*, distribusi data dikatakan normal apabila nilai  $p > 0.05$ . Selanjutnya dilakukan uji varians *Levene's Test* untuk mengetahui suatu kelompok data memiliki varians yang sama atau tidak yang mana data dikatakan homogen bila menghasilkan nilai  $p > 0.05$ .

Setelah itu, dilakukan analisis pada hipotesis 1 dan 2 menggunakan *software Statistical Product and Service Solution, IBM SPSS Statistics 20*, dengan nilai probabilitas 0.05 ( $p = 0.05$ ) dan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Pada uji hipotesis 1 dapat digunakan uji korelasi *Pearson* dengan syarat yang harus dipenuhi yaitu distribusi data normal ( $p > 0.05$ ) dan varians data homogen ( $p > 0.05$ ). Apabila syarat dari uji *Pearson* tidak terpenuhi, maka dilakukan uji statistik non-parametrik *Spearman*. Selanjutnya untuk hipotesis 2 dianalisis menggunakan uji komparatif (uji T tidak berpasangan) dengan syarat distribusi normal ( $p > 0.05$ ) dan varians data homogen ( $p > 0.05$ ).

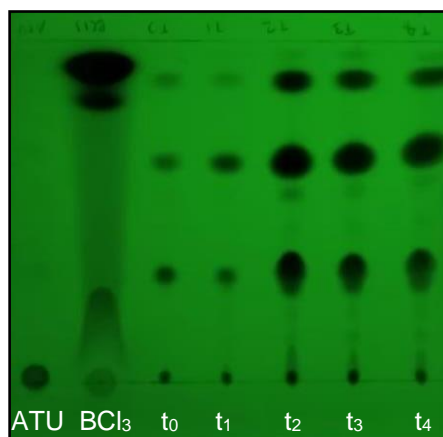
Apabila syarat pada uji T tidak berpasangan tidak dapat terpenuhi, maka dilakukan uji statistika non-parametrik *Mann-Whitney*.

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

#### 5.1 Sintesis Senyawa BATU- 3

Selama proses sintesis BATU-3, telah dilakukan refluks selama 4 jam. Cuplikan produk yang telah terbentuk dari proses refluks diambil tiap jam ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ ) untuk diuji dengan KLT pada fase gerak N-heksana:Kloroform:Edtil aasetat (8 : 3 : 1). Tujuan pengujian dengan KLT ini adalah untuk memastikan dan membandingkan produk yang telah terbentuk setelah dilakukan refluks selama 4 jam. Hasil KLT dari sebelum dilaksanakannya refluks ( $t_0$ ) hingga akhir ( $t_4$ ) menunjukkan bahwa terdapat noda baru yang muncul yakni pada noda ketiga yang sebelumnya tidak ada pada aliltiourea dan benzoilklorida. Hal ini menunjukkan bahwa telah terbentuk senyawa baru seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1 Uji KLT refluks BATU-3 selama 4 jam ( $t_0 - t_4$ )**

Keterangan:

ATU : Aliltiourea

$\text{BCl}_3$  : Benzoilklorida

$T_0$  : Sebelum dilakukan refluks

$T_1$  : Setelah 1 jam dilakukan refluks

- $T_2$  : Setelah 2 jam dilakukan refluks  
 $T_3$  : Setelah 3 jam dilakukan refluks  
 $T_4$  : Setelah 4 jam dilakukan refluks

### 5.1.1 Rendemen dan Organoleptis Kristal Senyawa BATU-3

Pada sintesis senyawa BATU-3 dihasilkan produk senyawa dalam bentuk serbuk berwarna putih kekuningan sebanyak 1,5598 g seperti yang dapat dilihat pada Tabel 5.1. Setelah sintesis, serbuk produk direkristalisasi. Hasil rekristalisasi dari senyawa BATU-3 berupa kristal berbentuk jarum berwarna putih seperti pada Gambar 5.1. Perhitungan kristal BATU-3 dapat dilihat pada Tabel 5.2.



**Gambar 5.2 Bentuk Kristal BATU-3 (setelah rekristalisasi) secara makroskopis**

**Tabel 5.1 Serbuk Senyawa Produk BATU-3**

Mol Aliltiourea	Mol 3-kloroben-zoil klorida	Mol Produk	Mr Produk	Massa Teoritis	Massa Serbuk yang Terbentuk
0,024 mol	0,02 mol	0,02 mol	254,74 g/mol	5,0948 g	1,5598 g

**Tabel 5.2 Persen Rendemen Kristal Senyawa Produk BATU-3**

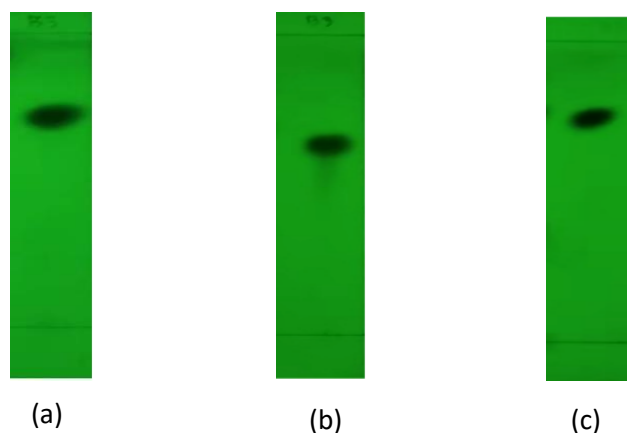
Massa Serbuk yang Ditimbang	Massa Kristal yang Terbentuk	% Rendemen Kristal
0,8088 g	0,6349 g	12,4617%

### 5.1.2 Hasil Uji Kemurnian BATU-3

Pada senyawa hasil sintesis BATU-3 dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan dua metode, yaitu metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan metode pengukuran rentang titik lebur.

#### 5.1.2.1 Hasil Uji Kemurnian KLT

Kemurnian senyawa hasil sintesis BATU-3 diuji dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menggunakan lempeng KLT silika GF<sub>254</sub> sebagai fase diam dan tiga komponen fase gerak dengan komposisi yang berbeda. Penggunaan tiga komponen fase gerak dengan jenis yang berbeda pada penelitian ini yaitu untuk meningkatkan pemisahan (resolusi) dari sampel yang diuji. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan komponen non-polar, semi-polar, dan polar. Oleh karena itu, penggunaan tiga macam eluen dengan jenis yang berbeda dapat memperluas rentang kepolarannya, sehingga didapatkan hasil yang lebih representatif dan lebih valid (Wulandari, 2011; Forestryana & Arnida, 2020). Fase gerak yang digunakan adalah (a) N-Heksana:Kloroform:Etil Asetat (8:3:1); (b) N-Heksana:Etil Asetat (5:1); dan (c) N-Heksana:Tetrahidrofuran (2:1). Hasil uji kemurnian dari tiap-tiap fase gerak dapat dilihat pada Gambar 5.3 di bawah ini:



**Gambar 5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan Metode KLT**

(a) Fase gerak N-Heksana:Kloroform:Etil Asetat (8:3:1). (b) Fase gerak N-heksana:Etil Asetat (5:1); (c) N-Heksana:Tetrahidrofuran (2:1)

**Tabel 5.3 Hasil Jumlah Noda dan Nilai Rf Uji KLT**

Komposisi Fase Gerak	Perbandingan Fase Gerak	Nilai RF	Jumlah Noda
n-heksana:kloroform:etil asetat	8:3:1	0,77	1
n-heksana:etil asetat	5:1	0,68	1
n-heksana:tetrahidrofuran	2:1	0,8	1

Pada hasil uji KLT senyawa produk sintesis BATU-3, didapatkan noda tunggal pada ketiga fase gerak dengan kepolaran yang berbeda. Munculnya noda tunggal ini menunjukkan bahwa produk hasil sintesis yang didapat telah sesuai dengan literatur. Pada penelitian Hasibuan (2007), suatu senyawa dikatakan murni apabila terdapat satu noda tunggal pada hasil uji KLT. Maka, hasil uji KLT untuk BATU-3 seperti pada Gambar 5.3 dapat dikatakan murni, dan untuk nilai Rf BATU-3 dapat dilihat pada Tabel 5.3.

#### 5.1.2.2 Hasil Uji Kemurnian Rentang Titik Lebur

Uji kemurnian senyawa BATU-3 menggunakan pengukuran rentang titik lebur dilakukan dengan mengamati perubahan senyawa yang terjadi pada tiga titik berbeda. Titik (1) yakni pada saat terjadi perubahan warna pada senyawa, (2) senyawa mulai melebur atau saat pertama terbentuk

cairan, kemudian dilanjutkan dengan (3) saat senyawa melebur atau mencair seluruhnya. Metode pengukuran rentang titik lebur pada senyawa BATU-3 dilakukan dengan menggunakan instrumen *Electrothermal*. Pengujian dilakukan dengan meningkatkan suhu sebesar  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ , setelah itu dilakukan perhitungan pada rentang titik lebur kristal mulai dari melelehnya kristal pertama (M2) kristal pertama hingga melebur sempurna (M3). Hasil dari uji kemurnian ini berupa data rentang titik lebur dari senyawa BATU-3 yang dapat dilihat pada Tabel 5.4.

**Tabel 5.4 Hasil Rentang Titik Lebur Senyawa BATU-3**

Replikasi	M1	M2	M3	Rentang Titik Lebur (M3-M2) ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	67,7	67,8	69,1	1,3
2	66,7	67,7	68,9	1,2
3	66,7	67,6	68,8	1,2
<b>Rata-Rata</b>				<b>1,23</b>

Keterangan:

M1: Suhu ketika terjadi perubahan warna pada senyawa

M2: Suhu ketika kristal pertama terbentuk cairan atau melebur

M3: Suhu ketika kristal melebur sempurna

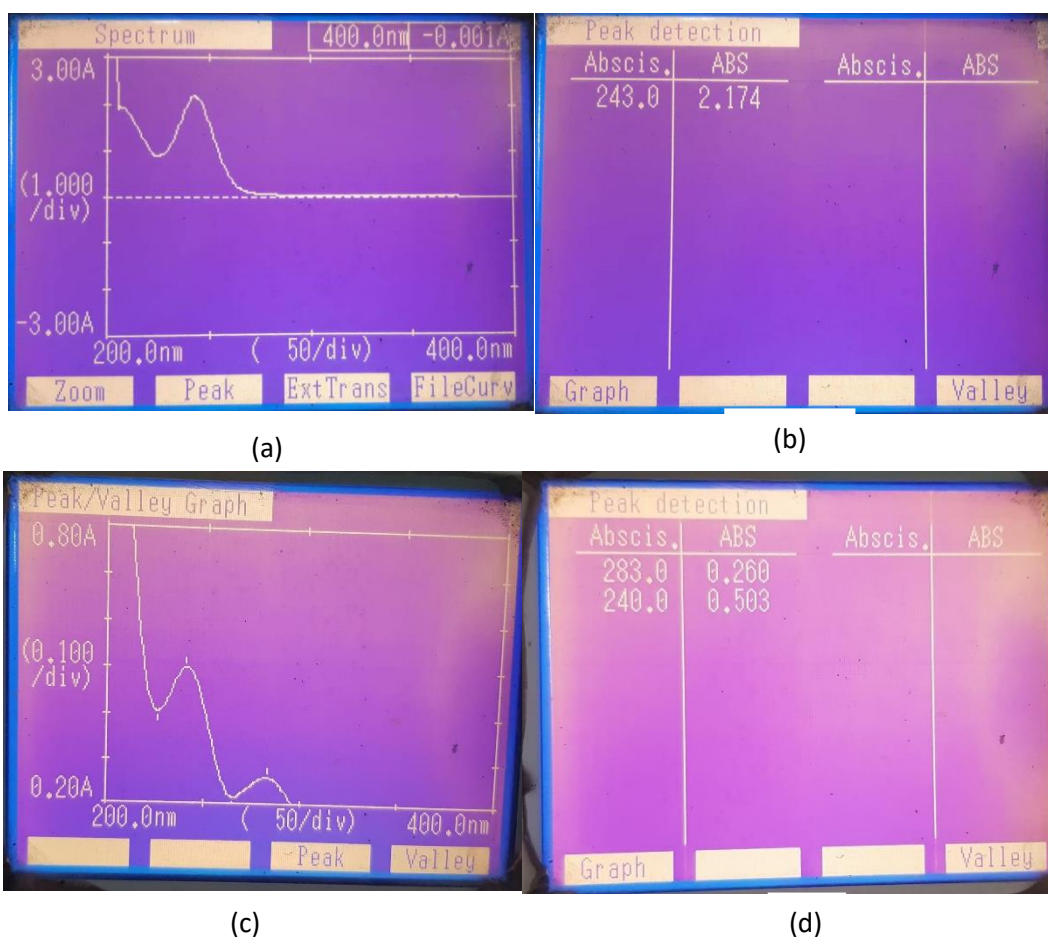
Berdasarkan data uji kemurnian rentang titik lebur pada senyawa BATU-3, didapatkan: (1) rentang titik lebur replikasi pertama sebesar  $1,3^{\circ}\text{C}$ ; (2) pada replikasi kedua sebesar  $1,2^{\circ}\text{C}$ ; dan (3) rentang titik lebur pada replikasi ketiga sebesar  $1,2^{\circ}\text{C}$ , sehingga dari ketiganya didapatkan rata-rata rentang titik lebur BATU-3 sebesar  $1,23^{\circ}\text{C}$ . Menurut Hart *et al.* (2012), suatu padatan dikatakan murni bila memiliki rentang titik leleh yang sangat sempit (hanya  $1-2^{\circ}\text{C}$ ), sehingga dari hasil uji rentang titik lebur pada senyawa

BATU-3, dapat dinyatakan bahwa senyawa BATU-3 merupakan senyawa murni.

### 5.1.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-3

#### 5.1.3.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri UV

Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometer UV untuk senyawa alitiourea dan senyawa BATU-3 ditunjukkan pada Gambar 5.4. Namun sejauh ini, belum ada penelitian ataupun sumber yang menyatakan panjang gelombang dari senyawa alitiourea dan BATU-3 secara pasti.



**Gambar 5.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektrofotometri UV**

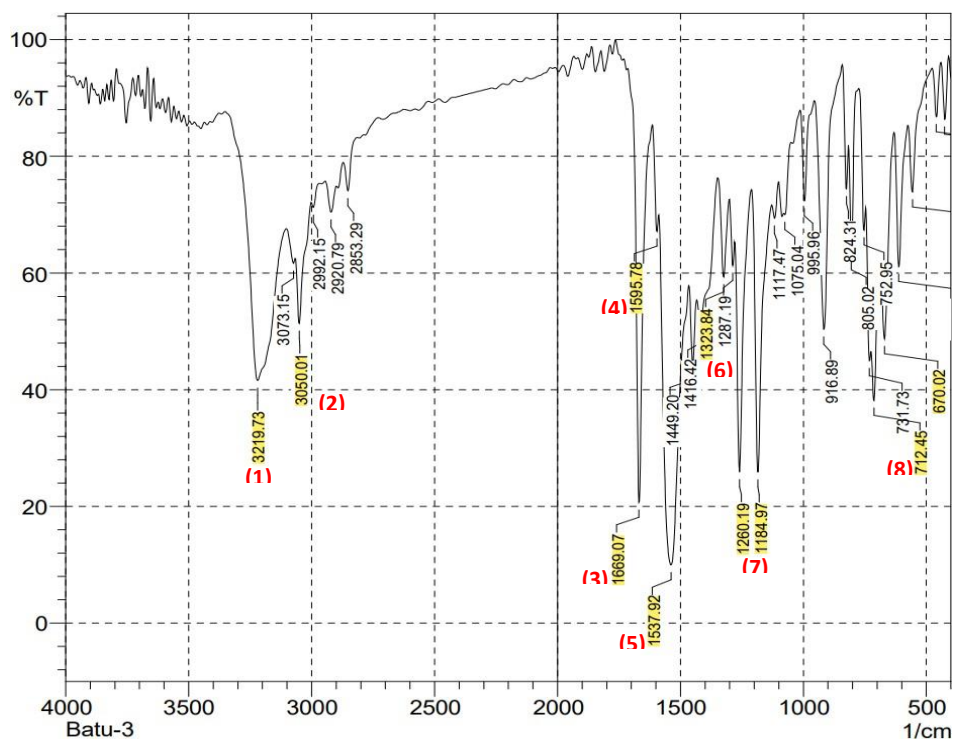
(a) Spektrum senyawa Alitiourea; (b) Deteksi panjang gelombang peak senyawa Alitiourea; (c) Spektrum BATU-3; (d) Deteksi panjang gelombang peak senyawa BATU-3



Berdasarkan spektrum hasil uji spektrofotometri pada Gambar 5.4 (a) diperoleh 1 peak pada senyawa aliltiourea dengan panjang gelombang 243 nm yang ditunjukkan pada gambar (b). Sementara itu, pada Gambar 5.4 untuk senyawa BATU-3 terdapat pada gambar (c) yaitu 2 peak yang muncul dengan panjang gelombang 240 nm dan 283 nm yang dilihat pada gambar (d). Hal ini pun didukung oleh Suhartati (2017) yang menyebutkan bahwa pada spektrofotometri UV diperlukan senyawa dengan gugus kromofor yang berperan untuk menyerap cahaya di daerah ultraviolet. Dengan demikian, munculnya *peak* baru pada gambar (c) menunjukkan bahwa terdapat penambahan gugus kromofor baru yang mengindikasikan bahwa terbentuk senyawa baru yang berbeda dengan aliltiourea. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa peak panjang gelombang senyawa aliltiourea ialah 240 nm, sedangkan untuk peak pada panjang gelombang 283 nm adalah panjang gelombang dari senyawa BATU-3.

#### **5.1.3.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Inframerah (IR)**

Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri inframerah untuk senyawa BATU-3 dapat dilihat pada spektra yang ditunjukkan oleh Gambar 5.5, sedangkan interpretasi hasil spektra BATU-3 dapat dilihat pada Tabel 5.5.



Gambar 5.5 Spektra IR Senyawa BATU-3

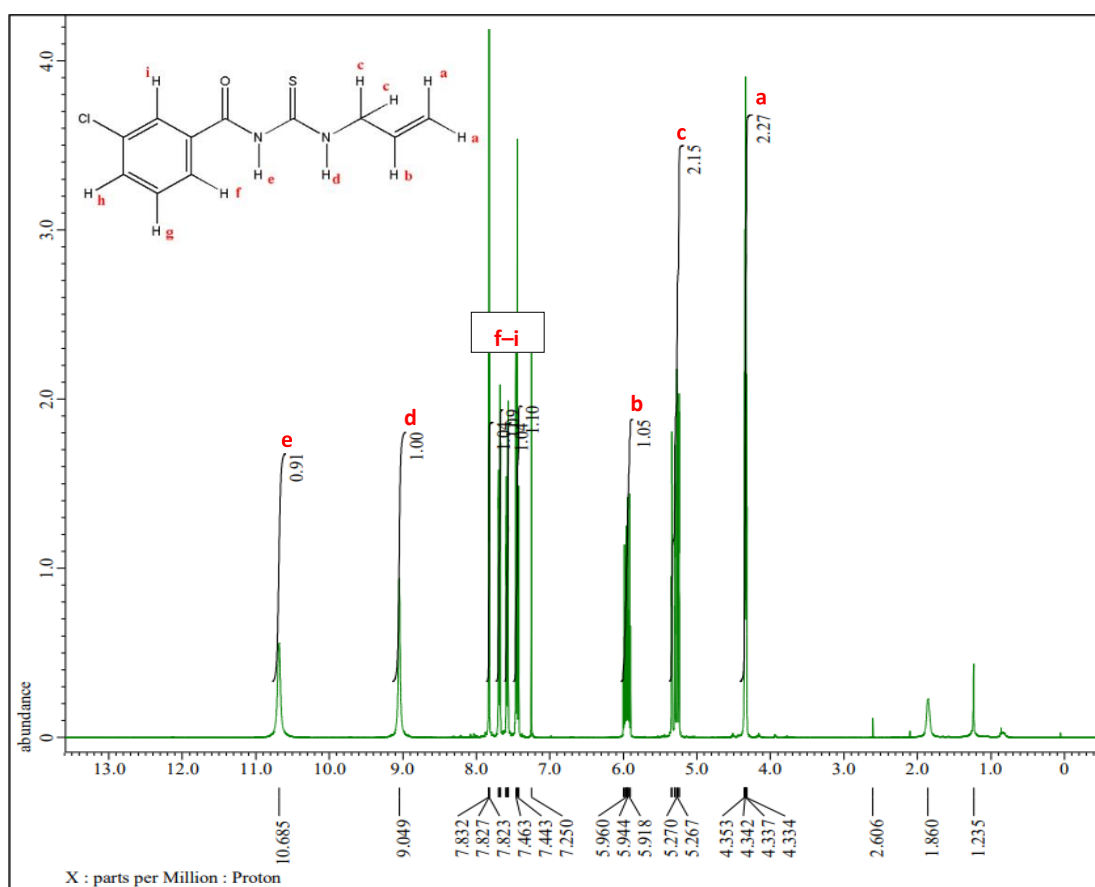
Tabel 5.5 Interpretasi Hasil Spektra IR Senyawa BATU-3

Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )					
No	Senyawa BATU-3	Literatur (Pavia et al., 2015)	Intensitas	Bentuk	Tipe Vibrasi
(1)	3219,73	3500-3100	Sedang (m)	Lebar	N-H ( <i>Stretch</i> )
(2)	3050,01	3150-3050	Kuat (s)	Tajam	C-H (Aromatis)
(3)	1669,07	1700-1640	Kuat (s)	Tajam	C=O (Amida)
(4)	1260,19-1184,97	1350-1000	Kuat (s)	Tajam	C-N
(5)	1595,78	1680-1600	Sedang (m)	Tajam	C=C (Alkena)
(6)	1537,92	1600-1475	Kuat (s)	Lebar	C=C (Aromatis)
(7)	1323,84	1350-1140	Sedang (m)	Lebar	(C=S)
(8)	712,45	785,540	Kuat (s)	Tajam	C-Cl
(9)	670,02	700-600	Kuat (s)	Tajam	Substitusi Meta

### 5.1.3.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektrometri NMR

#### 5.1.3.3.1 Hasil $^1\text{H}$ -NMR

Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri  $^1\text{H}$ -NMR untuk senyawa BATU-3 dapat dilihat pada hasil spektra yang ditunjukkan oleh Gambar 5.6 dan interpretasi hasil spektra  $^1\text{H}$ -NMR senyawa BATU-3 dapat dilihat pada Tabel 5.6.



Gambar 5.6 Spektra  $^1\text{H}$ -NMR BATU-3

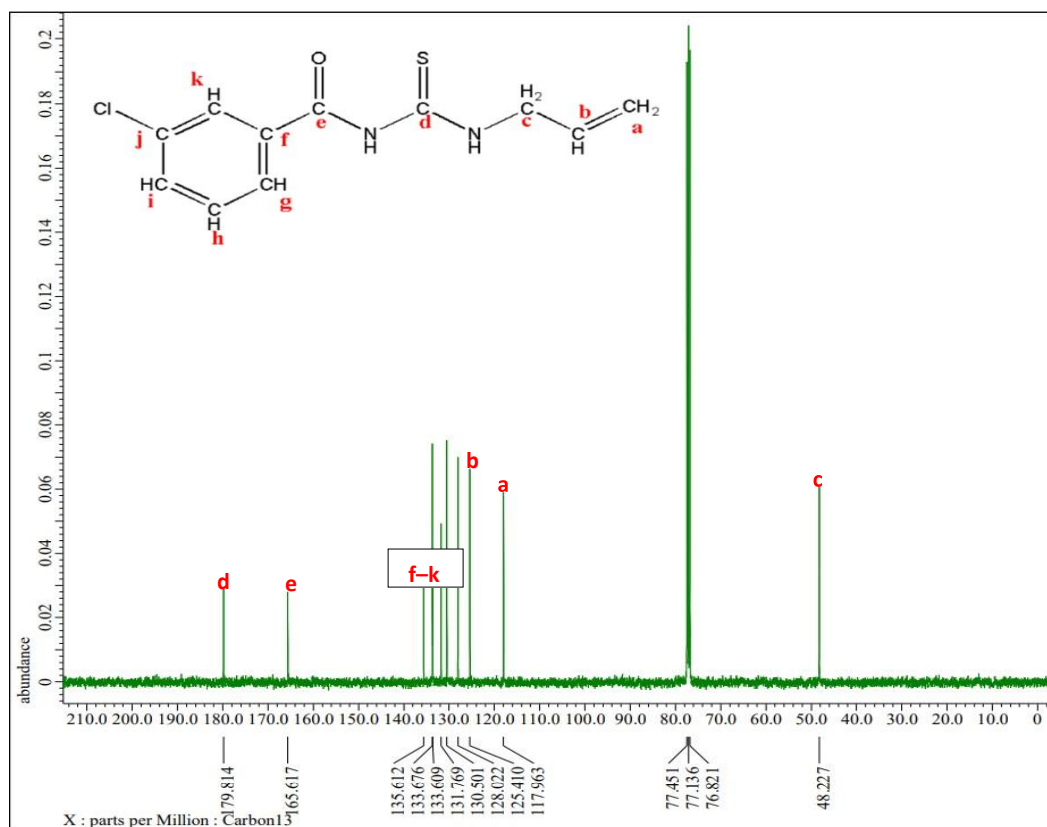
]Tabel 5.6 Interpretasi Hasil Spektra  $^1\text{H}$ -NMR Senyawa BATU-3

Geseran kimia (ppm) $\delta$	Perbandingan Integrasi	Multiplikasi	No. Proton	Jenis Proton	Rentang Geseran Kimia $\delta$ (ppm) (Pavia, <i>et al.</i> , 2015; Babij <i>et al.</i> , 2016)
10,685	0,91	Singlet	e	1 atom H dari -NH	5,0-9,0
9,049	1,00	Singlet	d	1 atom H dari -NH	5,0-9,0
7,832-7,823	1,04	Singlet	i	1 atom H dari benzena	6,5-8,0
7,698-7,673	1,09	Doublet	f	1 atom H dari benzena	6,5-8,0
7,594-7,565	1,04	Doublet	h	1 atom H dari benzena	6,5-8,0
7,463-7,423	1,10	Triplet	g	1 atom H dari benzena	6,5-8,0
7,250	-	Singlet	-	Residual Chloroform-D	7,26
6,000-5,904	1,05	Multiplet	b	1 atom H dari alil	4,5-6,5
5,345-5,241	2,15	Quartet	c	2 atom H dari alil	4,5-6,5
4,353-4,321	2,27	Multiplet	a	2 atom H dari alil	4,5-6,5

Berdasarkan spektra  $^1\text{H}$ -NMR yang telah dibandingkan dengan literatur (Pavia, *et al.*, 2013), didapatkan hasil interpretasi spektra  $^1\text{H}$ -NMR senyawa BATU-3 yang menunjukkan bahwa senyawa BATU-3 memiliki 11 atom H dengan 9 jenis atom H berada pada lingkungan yang berbeda.

#### 5.1.3.3.2 Hasil $^{13}\text{C}$ -NMR

Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri  $^{13}\text{C}$ -NMR dari senyawa BATU-3 tertera pada Gambar 5.7, sedangkan interpretasi hasil spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR ditunjukkan pada Tabel 5.7.

Gambar 5.7 Spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR Senyawa BATU-3Tabel 5.7 Interpretasi Hasil Spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR Senyawa BATU-3

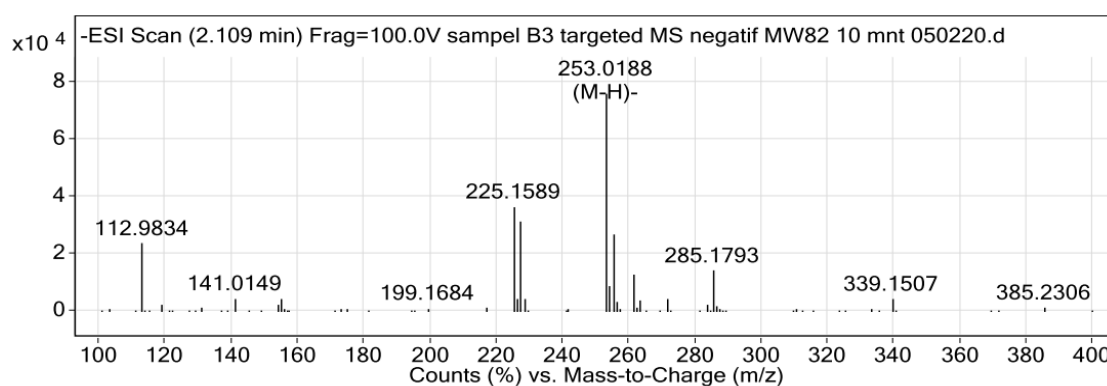
Geseran kimia $\delta$ (ppm)	No. Carbon	Jenis Carbon	Rentang Geseran Kimia $\delta$ (ppm) (Pavia, <i>et al.</i> , 2015; Babij <i>et al.</i> , 2016)
179,814	d	1 atom C dari C=S	155-185
165,617	e	1 atom C dari C=O	155-185
135,612	f	1 atom C dari benzena (-C-C=O)	110-175
133,676	j	1 atom C dari benzena (-C-Cl)	110-175
133,609	i	1 atom C dari benzena	110-175
131,769	h	1 atom C dari benzena	110-175
130,501	k	1 atom C dari benzena	110-175
128,002	g	1 atom C dari benzena	110-175
125,410	b	1 atom C dari -C=C	110-175
117,963	a	1 atom C dari -C=C	100-150
76,821-77,451	-	Residual Chloroform-D	77,06 $\pm$ 0,03
48,227	c	1 atom C dari -C-N	30-65

Berdasarkan spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR yang telah dibandingkan dengan literatur yang ada (Pavia, *et al.*, 2009), maka didapatkan hasil interpretasi spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR dari senyawa BATU-3. Pada hasil interpretasi ditunjukkan bahwa senyawa BATU-3 memiliki 11 atom C yang masing-masing memiliki lingkungan yang berbeda.

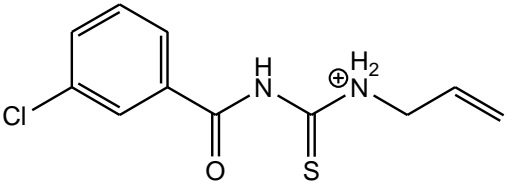
#### 5.1.3.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Spektroskopi Massa

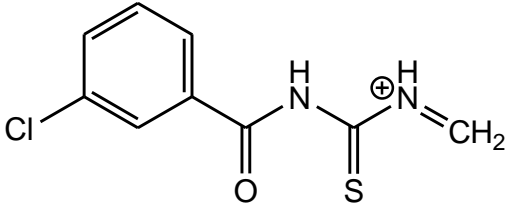
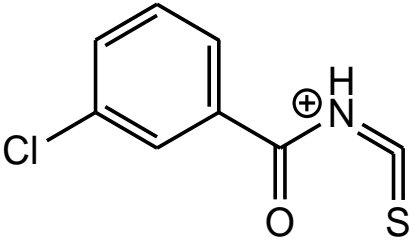
Hasil uji konfirmasi struktur spektroskopi massa untuk senyawa BATU-3 dapat dilihat pada hasil spektra yang ditunjukkan oleh Gambar 5.8 dan untuk interpretasi hasil spektrum massa dapat dilihat pada Tabel 5.8.

**Gambar 5.8 Spektra Massa Senyawa BATU-3**



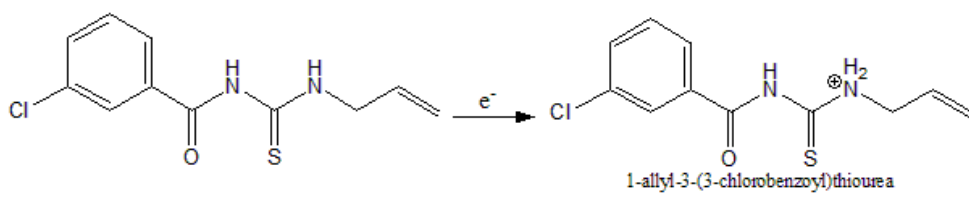
**Tabel 5.8 Interpretasi Hasil Spektra Massa Senyawa BATU-3**

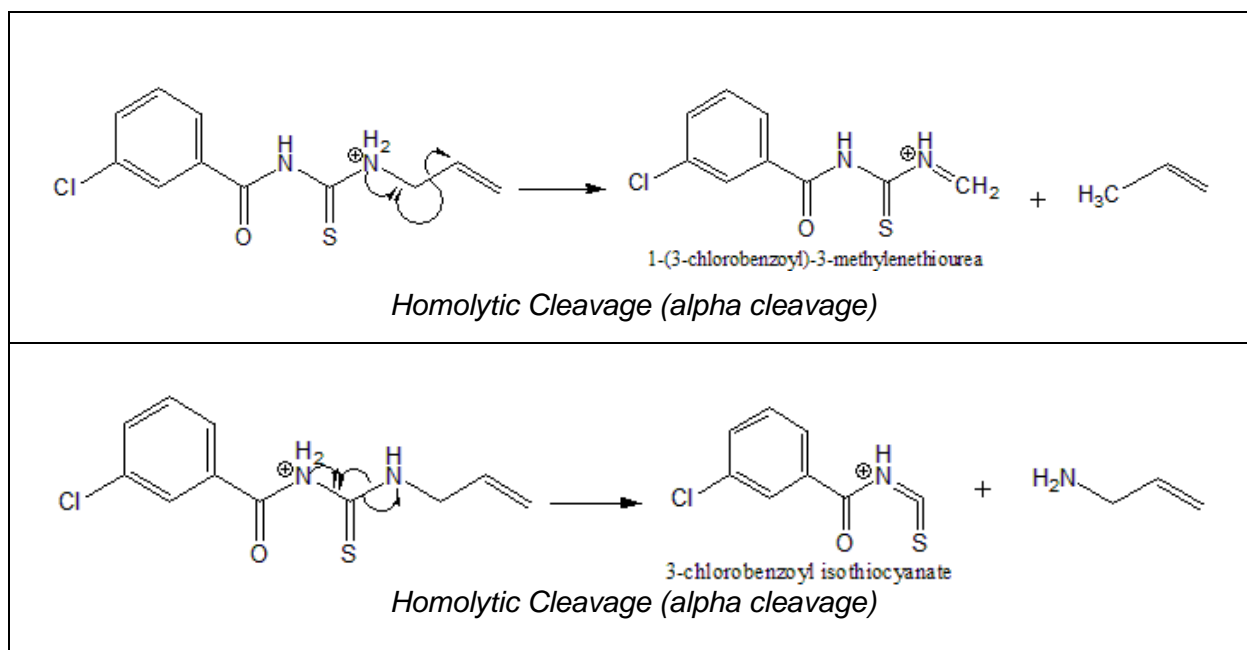
Fragmen Massa BATU-3 (m/z)	Fragmentasi	Rumus Molekul	Massa Teoritis (g/mol)
255,0157	 <p><i>1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea</i></p>	$[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}]^+$	254,74

227,1997	 <i>1-(3-chlorobenzoyl)-3-methylenethiourea</i>	$[\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_2\text{OS}]^+$	227,69
199,1684	 <i>3-chlorobenzoylthiocyanate</i>	$[\text{C}_8\text{H}_4\text{ClNOS}]^+$	198,65

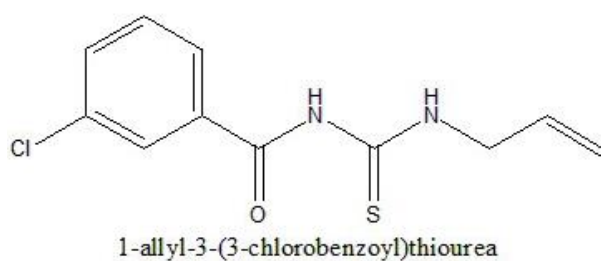
Berdasarkan spektrum massa pada Gambar 5.8 dan interpretasi hasil fragmen yang disajikan pada Tabel 5.8, diperoleh 3 fragmen massa, meliputi 255.0157 m/z yang merupakan fragmen massa dari senyawa BATU-3 ( $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}]^+$ ); 227.1997 m/z adalah fragmen massa dari senyawa *1-(3-chlorobenzoyl)-3-methylenethiourea* ( $[\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_2\text{OS}]^+$ ); dan 199.1684 m/z merupakan fragmen massa senyawa *3-chlorobenzoylthiocyanate* ( $[\text{C}_8\text{H}_4\text{ClNOS}]^+$ ). Untuk pola fragmentasi dari masing-masing fragmen massa dapat dilihat pada Tabel 5.9.

**Tabel 5.9 Pola Fragmentasi Senyawa BATU-3**

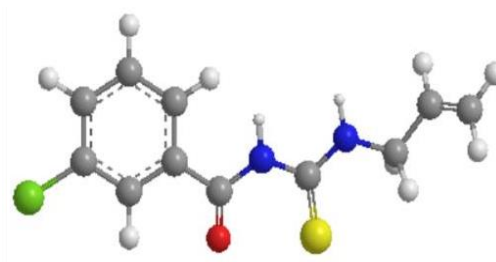
Pola Fragmentasi	
 <i>1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea</i>	$\xrightarrow{e^-}$



Atas dasar uji konfirmasi struktur yang telah dilakukan pada senyawa BATU-3, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa rumus kimia yang dimiliki oleh senyawa BATU-3 adalah  $C_{11}H_{11}ClN_2OS$  dengan nama IUPAC 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)tiourea. Struktur kimia yang didapatkan pada BATU-3 dapat dilihat pada Gambar 5.9



(a)



(b)

**Gambar 5.9 Struktur Senyawa 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)tiourea**  
 (a) Struktur 2D 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)tiourea; (b) Struktur 3D 1-allyl-3-(3-klorobenzoyl)tiourea



## **5.2 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea**

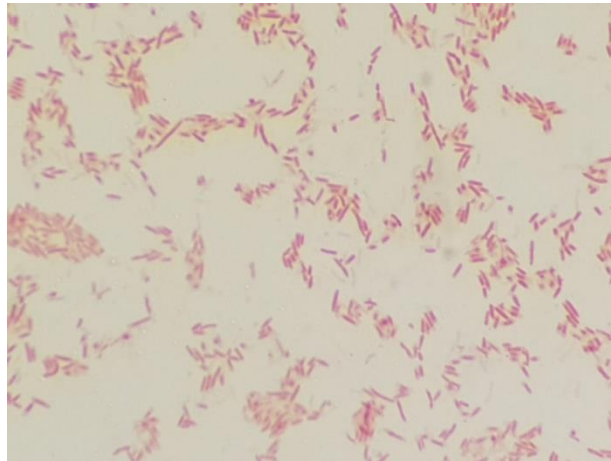
### **5.2.1 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli***

Identifikasi bakteri *E. coli* dilakukan dengan tiga pengujian, diantaranya yaitu uji pewarnaan Gram, kultur isolat bakteri pada media *MacConkey Agar*, dan kultur isolat bakteri pada media *Eosin Methylene Blue Agar*. Pada pengujian identifikasi bakteri *E. coli*, dilakukan dengan menggunakan satu isolat urin pasien ISK, yakni isolat 1 (kode 1223).

#### **5.2.1.1 Uji Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan antara bakteri Gram positif dan negatif berdasarkan permeabilitas dinding sel dan membran selnya. Pewarnaan Gram menunjukkan adanya kerusakan signifikan pada permukaan sel bakteri Gram negatif dan hanya sedikit kerusakan pada bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal dan sedikit lipid. Saat dekolorisasi, alkohol membuat pori-pori dinding sel mengecil, sehingga kristal violet tetap terikat erat pada dinding sel Gram positif. Akibatnya hasil akhir dari pewarnaan Gram untuk bakteri Gram positif yaitu sel berwarna ungu. Berbeda dengan Gram positif, bakteri Gram negatif tersusun dari peptidoglikan yang tipis namun memiliki banyak lipid. Pada saat dekolorisasi, alkohol melarutkan membran luar lipid dan membiarkan peptidoglikan terbuka. Hal ini menyebabkan kristal violet hilang dan memunculkan warna merah yang berasal dari safranin (Thairu, *et al.*, 2014). Hasil uji pewarnaan Gram yang dilakukan pada isolat 1 (kode 1223) menunjukkan bakteri berbentuk batang (basil) dan berwarna merah seperti

pada Gambar 5.10. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa isolat 1 (kode 1223) merupakan bakteri Gram negatif yang telah sesuai dengan *E. coli*.

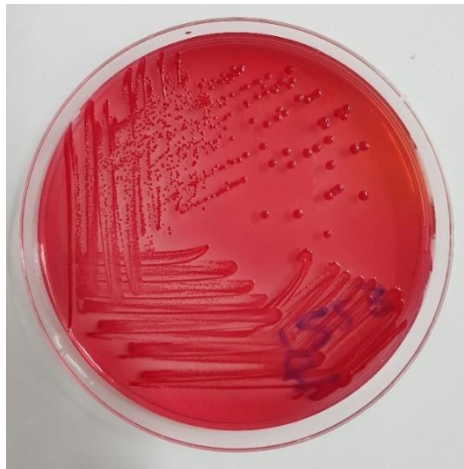


**Gambar 5.10 Gambaran Mikroskopik Pewarnaan Gram Isolat Bakteri *Escherichia coli* kode 1223 (Perbesaran 1000x)**

#### **5.2.1.2 Kultur Pada Media *MacConkey Agar* (MAC)**

Identifikasi menggunakan media kultur yang *selective* dan *differential* diperlukan untuk membedakan *E. coli* dengan bakteri Gram negatif lain. Salah satu media kultur yang paling sering digunakan untuk mengisolasi *E. coli* dari urin pasien ISK adalah *MacConkey agar* (MAC). MAC mengandung kristal violet dan garam empedu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, namun memungkinkan pertumbuhan pada bakteri Gram negatif. Selain itu, MAC dapat mengubah koloni fermentor laktosa menjadi berwarna merah muda dan membuat koloni nonfermentor tidak berwarna serta tembus cahaya. Hal ini disebabkan adanya gula laktosa dan indikator pH pada MAC (Black, 2008). *E. coli* merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memfermentasi laktosa, sehingga hasil kultur bakteri pada MAC merupakan koloni berwarna merah muda. Berdasarkan kultur isolat 1

(kode 1223) pada MAC menunjukkan bahwa koloni bakteri berubah warna menjadi merah muda seperti pada Gambar 5.11, sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif yang mampu memfermentasi laktosa sesuai dengan karakterisasi *E. coli*.

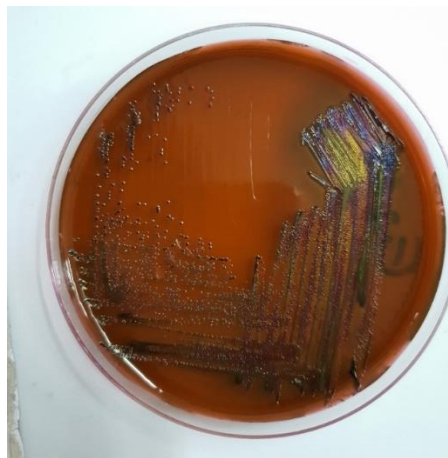


**Gambar 5.11 Kultur Isolat 1223 Pada Media *MacConkey Agar* (MAC)**

#### **5.2.1.3 Kultur Pada Media *Eosin Methylene Blue* (EMB)**

*Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) merupakan media selektif dan diferensial untuk bakteri Gram negatif. Media ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif karena mengandung *Eosin* dan *Methylene Blue*. Selain itu, kandungan karbohidrat laktosa yang ada pada media ini mampu mendiferensiasi bakteri Gram negatif berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi laktosa. *E. coli* merupakan bakteri yang mampu menghasilkan asam dari kemampuannya memfermentasi laktosa. Peningkatan kadar asam mengakibatkan terjadi penyerapan *eosin* dan *methylene blue* oleh koloni, sehingga koloni *E. coli* memiliki pusat gelap dan berwarna hijau

metalik (*green metallic sheen*) (Black, 2008). Hasil kultur isolat 1 (kode 1223) pada media EMBA menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri dengan pusat gelap dan berwarna hijau metalik atau *metallic sheen* yang dapat dilihat pada Gambar 5.12. Maka dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif yang mampu memfermentasi laktosa.



**Gambar 5.12 Kultur Isolat 1223 Pada Media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB)**

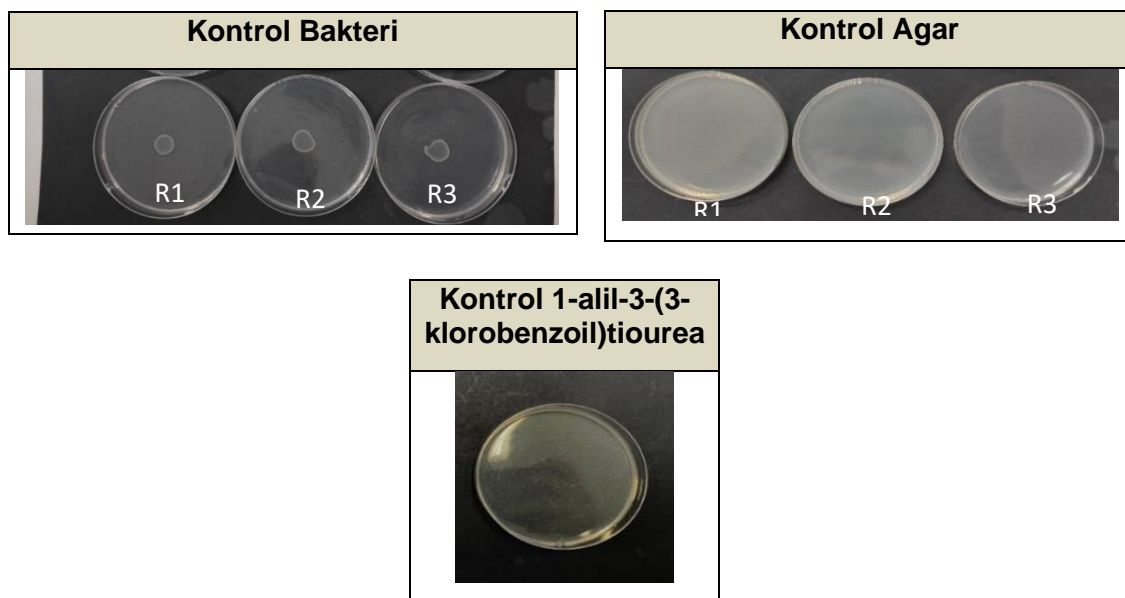
Berdasarkan ketiga uji identifikasi yang telah dilakukan pada isolate 1 (kode 1223), dapat disimpulkan bahwa isolat 1 (kode 1223) dapat diidentifikasi sebagai *E. coli* karena termasuk dalam bakteri Gram negatif yang mampu memfermentasi laktosa.

### **5.2.2 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi Agar**

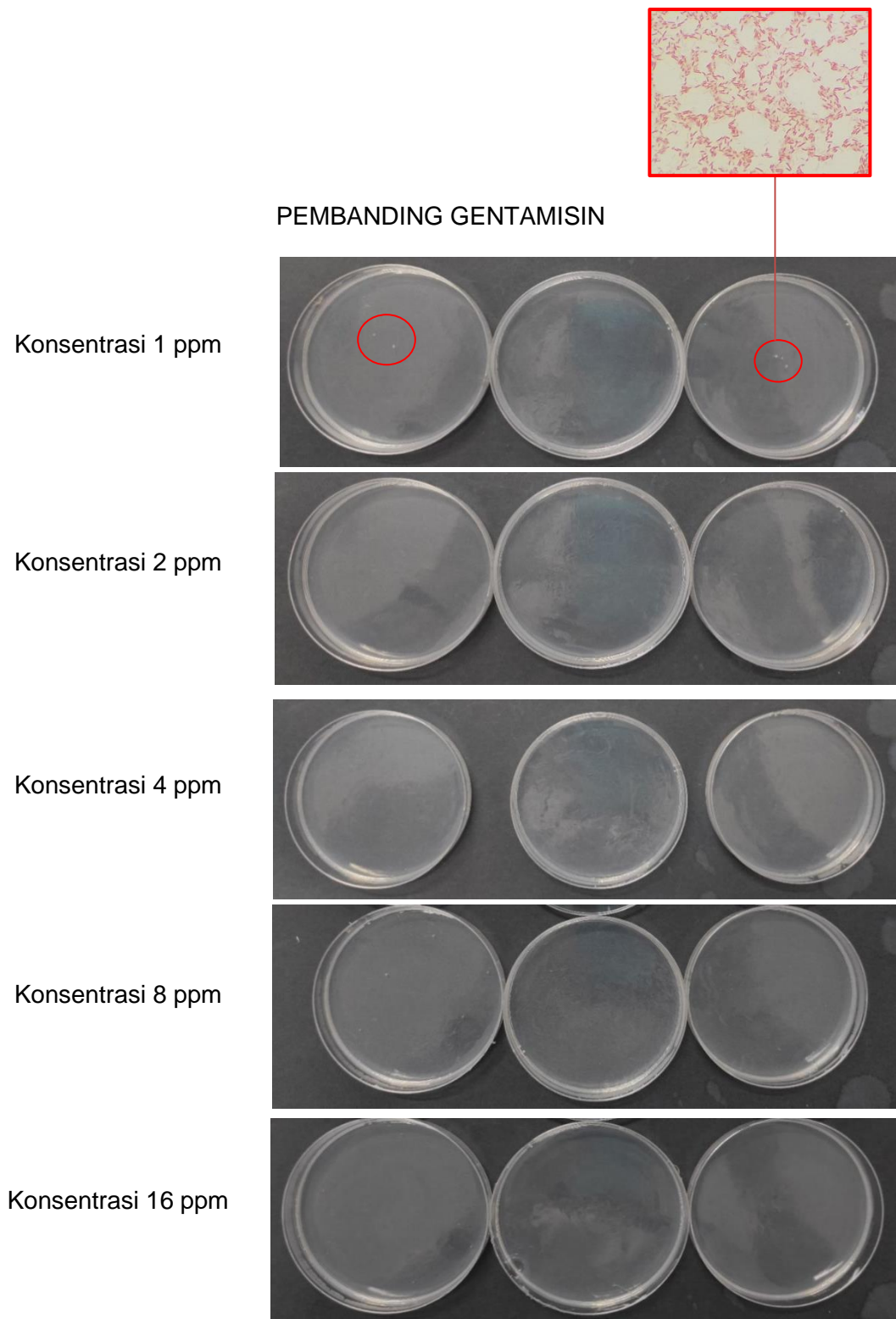
Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode dilusi agar untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea (BATU-3) terhadap isolat 1 (kode 1223) yang merupakan isolat bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) yang diambil dari urin pasien ISK. Data yang diperoleh pada uji aktivitas dengan metode dilusi

agar adalah nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). KHM adalah konsentrasi terendah dari senyawa uji yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. (Chikezie, 2017).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap kontrol bakteri (Tween-80), kontrol Agar, dan kontrol BATU-3 dapat dilihat pada Gambar 5.13; untuk hasil uji pada senyawa gentamisin dengan 5 konsentrasi berbeda dapat dilihat pada Gambar 5.14; dan untuk hasil uji senyawa BATU-3 dengan 8 konsentrasi berbeda ditunjukkan pada Gambar 5.15.

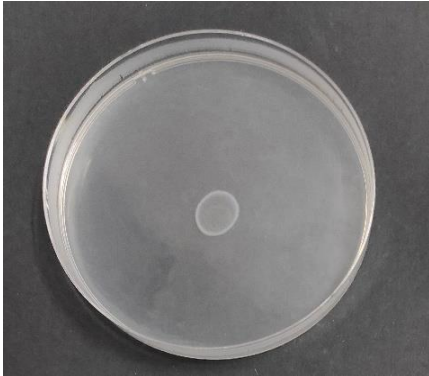
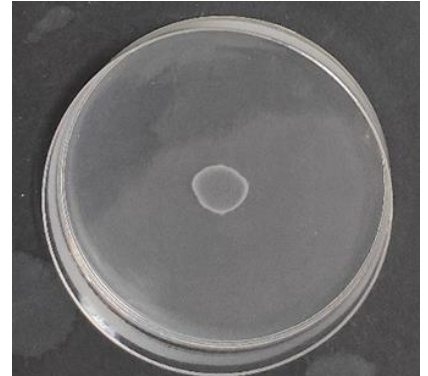
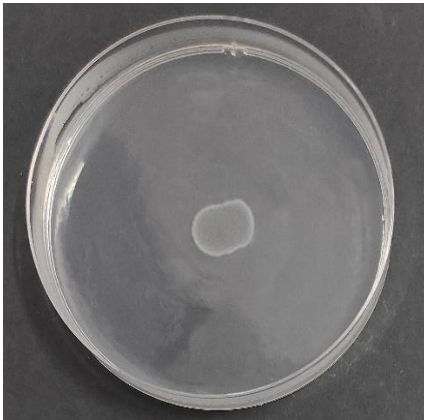
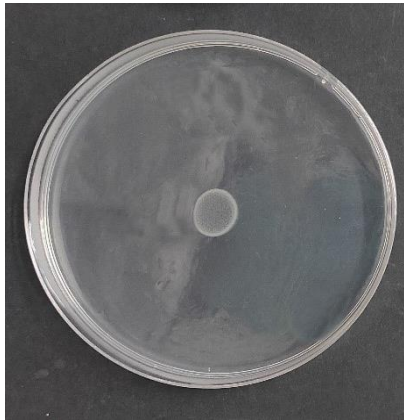
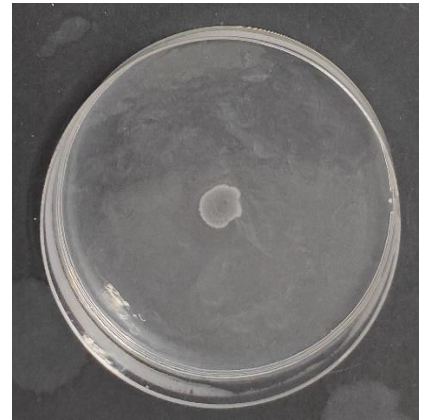
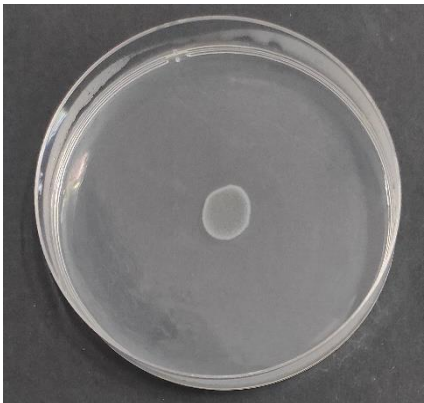
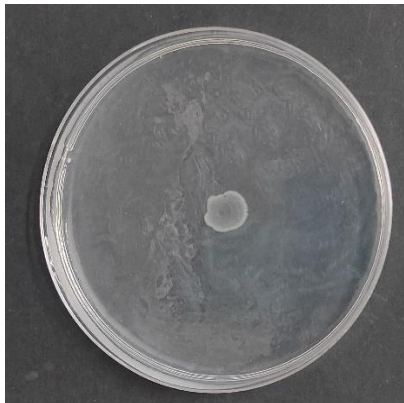
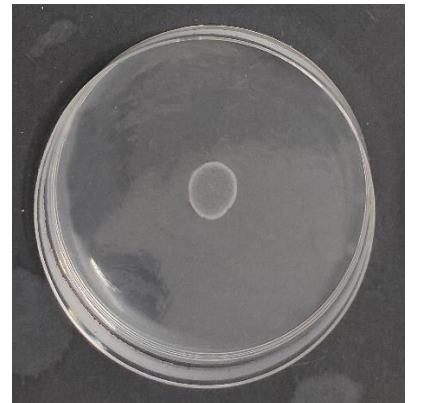


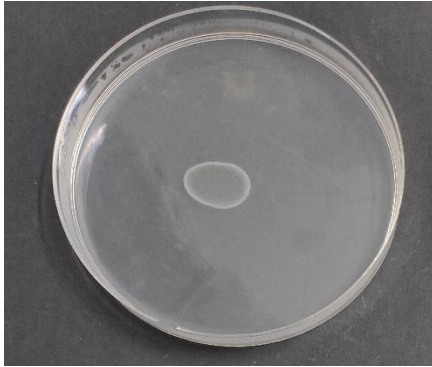
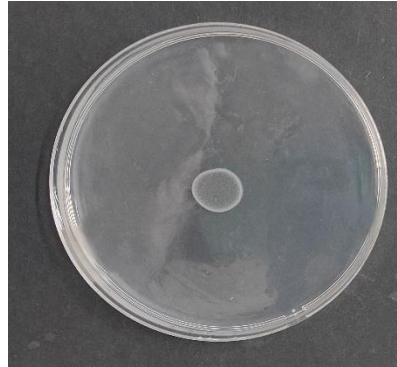
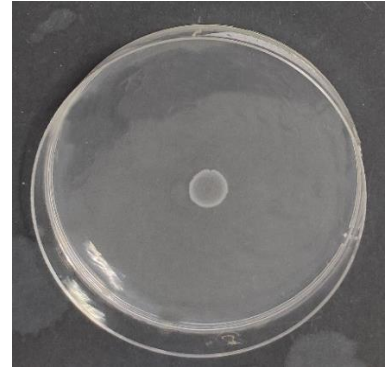
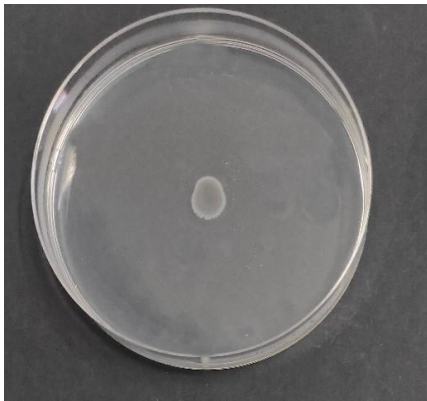
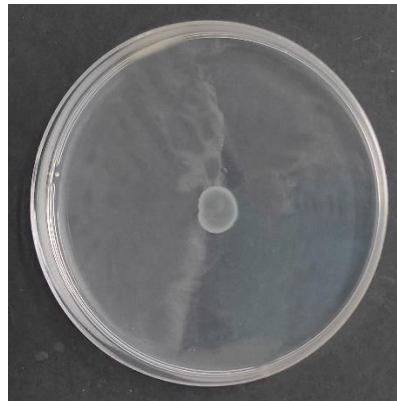
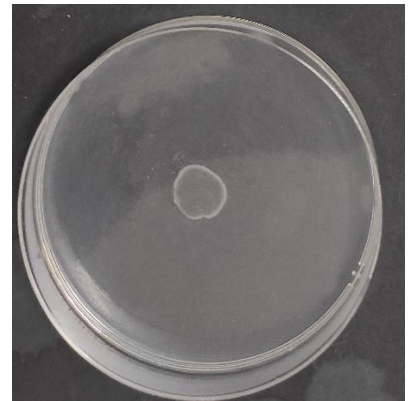
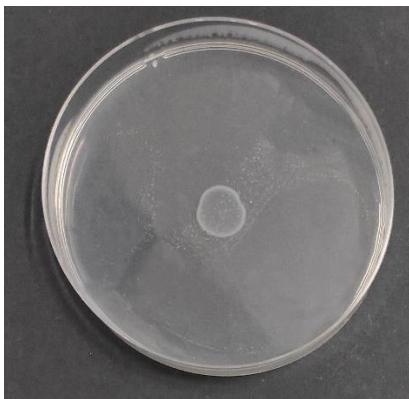
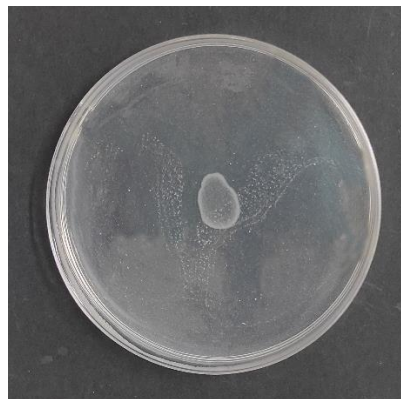
**Gambar 5.13 Hasil Uji Pada Kontrol Bakteri, Kontrol Agar, dan Kontrol BATU-3**



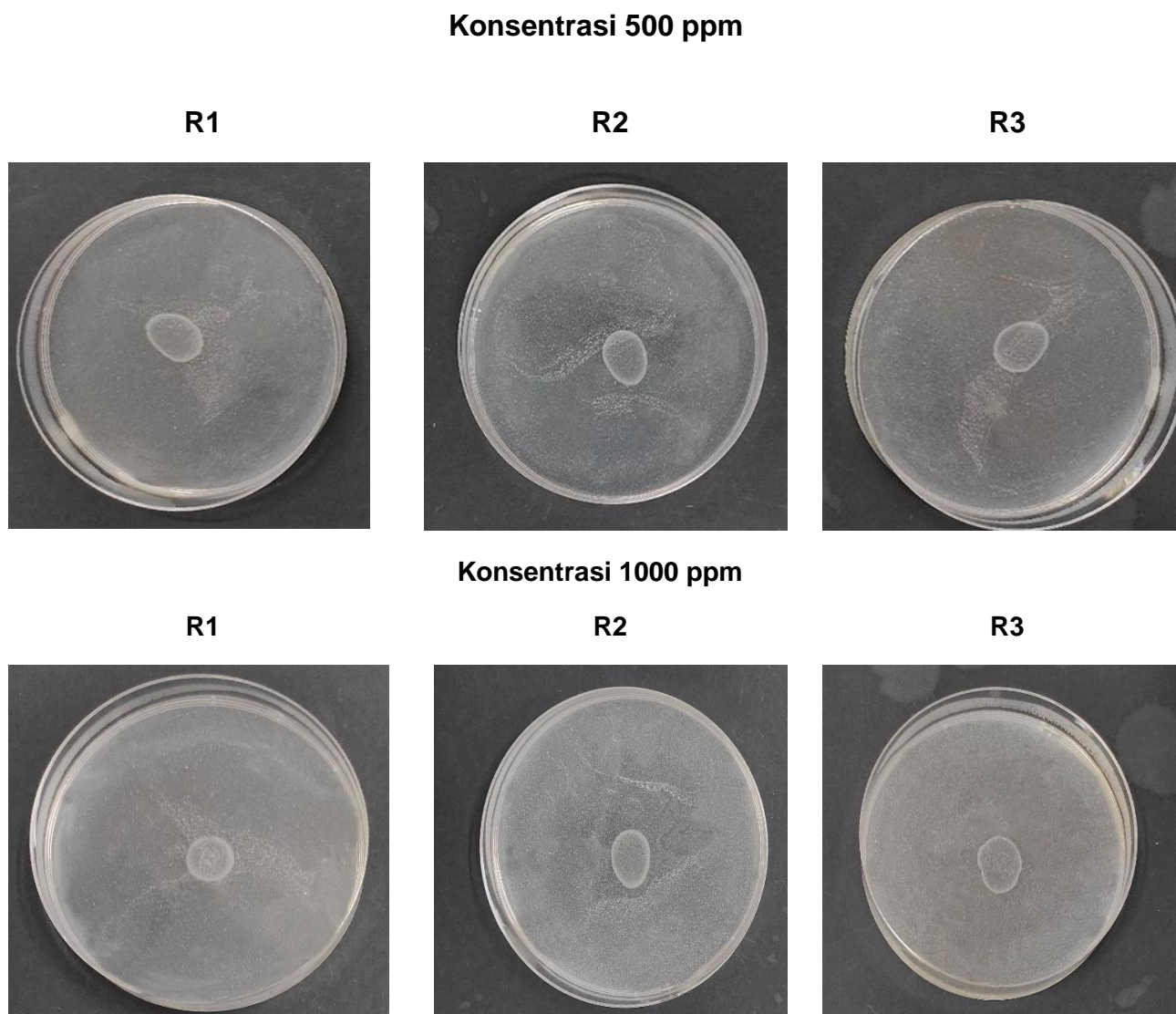
**Gambar 5.14 Hasil Uji Pada Pembanding Gentamisin**



**Konsentrasi 7,8125 ppm****R1****R2****R3****Konsentrasi 15,625 ppm****R1****R2****R3****Konsentrasi 31,25 ppm****R1****R2****R3**

**Konsentrasi 62,5 ppm****R1****R2****R3****Konsentrasi 125 ppm****R1****R2****R3****Konsentrasi 250 ppm****R1****R2****R3**





**Gambar 5.15 Hasil Uji Pada Senyawa 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea**

Keterangan:

R1 : Replikasi 1

R2 : Replikasi 2

R3 : Replikasi 3

Pada pengujian dengan metode dilusi agar, diketahui bahwa gentamisin mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini dibuktikan dengan didapatkannya nilai KHM gentamisin sebesar 2 ppm pada Gambar 5.14. Sedangkan pada Gambar 5.15 dapat diketahui bahwa tidak ada

penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea, sehingga nilai KHM senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak dapat ditentukan. Selain itu, untuk hasil skoring dari pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Tabel 5.10.

**Tabel 5.10 Skor Pertumbuhan *Escherichia coli* Setelah Perlakuan**

Kelompok Uji	Konsentrasi	Pengulangan			Rata-Rata
		1	2	3	
Senyawa Uji 1-Alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea	7,8125 ppm	3	3	2	3
	15,625 ppm	2	3	2	2
	31,25 ppm	3	2	3	3
	62,5 ppm	3	3	2	3
	125 ppm	2	2	2	2
	250 ppm	3	2	3	3
	500 ppm	3	3	2	3
	1000 ppm	3	3	2	3
Senyawa Pembanding (Gentamisin)	1 ppm	1	0	1	1
	2 ppm	0	0	0	0
	4 ppm	0	0	0	0
	8 ppm	0	0	0	0
	16 ppm	0	0	0	0
Kontrol Bakteri (Tween 80)	1600 ppm	3	3	2	3

Keterangan:

Skor 0 : Tidak ada pertumbuhan pada media agar

Skor 1 : Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan rendah

Skor 2 : Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan sedang

Skor 3 : Pertumbuhan koloni berwarna putih dengan kerapatan tinggi

Hasil pengukuran *scoring* pada senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi senyawa uji tidak mempengaruhi derajat pertumbuhan koloni. Hal ini dibuktikan dengan nilai yang diperoleh cenderung acak dan bervariasi. Sementara itu,

peningkatan konsentrasi gentamisin menunjukkan adanya peningkatan kemampuan penghambatan pertumbuhan koloni (skor linier).

### 5.3 Analisis Data

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan pada senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea, dapat diketahui bahwa nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak dapat ditentukan. Hal ini dikarenakan senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang telah direplikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing 8 serial konsentrasi yakni 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm, tidak menunjukkan adanya penghambatan bakteri, sehingga senyawa uji dipastikan tidak memiliki aktivitas antibakteri. Selain itu, peningkatan konsentrasi yang diberikan tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang dibuktikan dengan hasil yang didapatkan pada *scoring* menunjukkan nilai yang bervariasi. Sementara itu, pada pembanding gentamisin, didapatkan nilai KHM pada konsentrasi 2 ppm. Didapatkannya nilai KHM gentamisin pada dilusi agar menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan pada koloni bakteri *E. coli*. Hal ini didukung pula dengan adanya penghambatan pertumbuhan koloni bakteri yang dilihat dari nilai *scoring* yang cenderung teratur. Maka dapat disimpulkan bahwa antibiotik gentamisin memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Berdasarkan hasil yang didapatkan pada senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan senyawa pembanding gentamisin, sayangnya analisis statistik tidak dapat dilakukan karena tidak terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

dengan efek biologisnya sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* (hipotesis 1 ditolak). Kemudian tidak ditemukannya nilai KHM pada senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea menyebabkan KHM tidak bisa dibandingkan dengan KHM gentamisin (hipotesis 2 ditolak).

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea menggunakan metode *Schotten-Baumann* yang telah dimodifikasi. Reaksi yang terbentuk adalah reaksi substitusi nukleofilik senyawa aliltiourea terhadap senyawa 3-klorobenzoil klorida dengan trietilamin (TEA) yang berperan sebagai basa katalis dan tetrahidrofur sebagai pelarut. Metode sintesis yang digunakan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, sehingga diharapkan produk sintesis yang didapatkan sesuai dengan hasil yang diharapkan. Hasil yang didapatkan setelah proses sintesis berupa produk berbentuk serbuk berwarna putih kekuningan sebanyak 1,5598 gram.

Setelah dilakukan sintesis, produk serbuk senyawa yang dihasilkan dapat direkristalisasi menggunakan DMSO dan aquades. Rekristalisasi merupakan teknik pemurnian dengan mengkristalkan kembali suatu zat padat setelah dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Tujuan dari rekristalisasi ini adalah untuk memisahkan dan memurnikan zat padat dari campuran atau pengotornya, sehingga kualitas kristal yang didapat sesuai dengan parameter distribusi ukuran kristal, kemurnian kristal, dan bentuk kristal (Umam, 2019). Produk yang dihasilkan pada proses rekristalisasi berupa kristal berbentuk jarum dan berwarna putih dengan nilai rendemen yang didapatkan sebesar 12,4617%. Nilai rendemen yang didapat pada penelitian ini telah mendekati

nilai rendemen 1-alil-3-(3-klorobenzoil)riourea pada penelitian sebelumnya, yaitu sebesar 16,4% (Shalas, *et al*, 2018). Persen rendemen menandakan efisiensi dari suatu reaksi yang telah berlangsung. Semakin tinggi nilai rendemen, maka semakin banyak serbuk yang terbentuk. Namun, nilai rendemen yang didapatkan pada sintesis ini terbilang kecil, sehingga serbuk yang dihasilkan sedikit. Sedikitnya serbuk yang dihasilkan dapat disebabkan oleh banyaknya produk yang hilang saat proses pencucian senyawa dan dekantasi produk, selain itu adanya atom kloro pada substitusi *meta* mengakibatkan timbulnya efek induksi negatif yang dapat mempersulit jalannya reaksi (McMurry, 2012).

Untuk memastikan kemurnian dari produk senyawa uji, dilakukan uji kemurnian menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan rentang titik lebur (*melting point*). Pada uji KLT digunakan tiga kombinasi fase gerak dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Hasil uji KLT pada produk senyawa uji menunjukkan hanya terdapat satu noda yang muncul pada ketiga plat. Selain itu, senyawa uji memiliki nilai faktor retensi ( $R_f$ ) yang telah sesuai dengan persyaratan nilai  $R_f$  yang baik, yaitu sebesar 0,77; 0,68; dan 0,8.  $R_f$  merupakan parameter yang digunakan untuk menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi.  $R_f$  dikatakan baik bila berkisar 0,2 – 0,8, sehingga senyawa uji telah memenuhi persyaratan  $R_f$  yang baik (Wulandari, 2011). Selanjutnya, untuk uji rentang titik lebur pada senyawa uji didapatkan nilai rata-rata sebesar 1,23°C. Menurut Hart *et al.* (2012), diketahui bahwa senyawa murni memiliki rentang titik lebur yang sempit yaitu antara 1 - 2°C. Oleh karena itu, berdasarkan uji rentang titik lebur yang telah dilakukan dapat dikatakan bahwa senyawa uji merupakan senyawa yang murni.

Produk senyawa uji yang telah diuji kemurniannya dapat dilanjutkan dengan uji konfirmasi struktur menggunakan empat instrumen yang berbeda, yaitu dengan spektrofotometri UV, spektrofotometri IR, spektrometri  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR, serta spektroskopi massa. Spektrofotometri UV adalah instrumen yang mengandalkan interaksi antara senyawa organik dengan cahaya monokromatik. Untuk menentukan panjang gelombang dan absorbansinya, diperlukan senyawa yang mengandung kromofor sebagai gugus fungsi organik tak jenuh yang dapat menyerap cahaya di daerah ultraviolet atau sinar tampak. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran panjang gelombang pada senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan N-aliltiourea sebagai pembanding. Pada pengukuran senyawa uji terbentuk dua puncak dengan panjang gelombang 283 nm dan 240 nm. Sementara itu, pada N-aliltiourea terbentuk satu puncak dengan panjang gelombang 243 nm. Menurut Skoog *et al.* (2014), gugus tiokarbonil ( $\text{C}=\text{S}$ ) dan karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) merupakan kromofor dengan panjang gelombang maksimum 229 nm dan 293 nm. Oleh karena itu, dapat ditentukan bahwa senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki panjang gelombang 283 nm, sedangkan panjang gelombang 240 nm merupakan milik N-aliltiourea yang terdapat dalam produk, sehingga senyawa yang diinginkan dapat dikatakan sudah terbentuk.

Uji konfirmasi struktur yang dilakukan selanjutnya adalah uji spektrofotometri IR. Spektrofotometri IR berguna untuk mengidentifikasi gugus fungsi dalam suatu senyawa organik murni menggunakan pancaran radiasi inframerah. Energi inframerah dapat memicu terjadinya transisi getaran dan rotasi pada suatu molekul yang bergantung pada jumlah atom dan jumlah ikatannya (Skoog, *et al.*, 2014). Hasil data yang diperoleh akan

dibandingkan dengan literatur yang tersedia (Pavia, *et al.*, 2009) dan (Pavia, *et al.*, 2013) dengan melihat intensitas dan bilangan gelombang dari pita serapan pada spektrum yang terbentuk. Pada penelitian ini, didapatkan beberapa gugus fungsi penyusun senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea diantaranya, gugus fungsi N-H (*stretch*) pada bilangan gelombang 3219,73  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C-H (aromatis) pada bilangan gelombang 3050,01  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C=O ulur amida pada bilangan gelombang 1669,07  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C=C (alkena) pada bilangan gelombang 1595,78  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C=C (aromatis) pada bilangan gelombang 1537,92  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C=S pada bilangan gelombang 1323,84  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C-N pada bilangan gelombang 1260,19 – 1184,94  $\text{cm}^{-1}$ , gugus fungsi C-Cl pada bilangan gelombang 712,45  $\text{cm}^{-1}$ , dan substitusi meta pada bilangan gelombang 670,03  $\text{cm}^{-1}$ . Adanya gugus fungsi C=S yang juga dimiliki pereaksi N-aliltiourea dan gugus fungsi C-Cl pada pereaksi 3-klorobenzoil klorida menunjukkan bahwa senyawa yang terbentuk memang berasal dari campuran kedua pereaksi. Namun, munculnya gugus fungsi C=O yang sebelumnya tidak ada dalam kedua pereaksi menunjukkan bahwa telah terbentuk senyawa baru yang berbeda dari kedua senyawa pereaksi, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa uji yang dihasilkan pada proses sintesis telah sesuai dengan senyawa yang dilihat menggunakan spektroskopi inframerah.

Setelah itu dilakukan uji konfirmasi struktur dengan spektrometri NMR. Identifikasi senyawa dilakukan dengan mendeteksi energi radiasi radiofrekuensi yang diserap terhadap perubahan *nuclear spin state*. Dalam menginterpretasikan spektra perlu diperhatikan luas puncak, pemecahan puncak, dan pergeseran kimia. Pada uji  $^1\text{H}$ -NMR didapatkan spektrum seperti



pada Gambar 5.6 yang diinterpretasikan pada Tabel 5.6. Berdasarkan hasil analisa yang telah didapatkan, diketahui bahwa jumlah proton yang dimiliki senyawa produk adalah 11 proton dengan 9 jenis atom H yang berada pada lingkungan berbeda. Namun, pada spektrum terdapat kelebihan satu puncak pada pergeseran kimia 7,250. Satu puncak berlebih ini dapat diidentifikasi sebagai pelarut  $\text{CDCl}_3$  yang akan muncul pada 7,26 (s). Sementara itu, untuk hasil uji  $^{13}\text{C}$ -NMR didapatkan spektra pada Gambar 5.7 dan diinterpretasikan pada Tabel 5.7 yang menunjukkan bahwa senyawa uji memiliki 11 proton dengan 11 jenis atom C pada lingkungan yang berbeda. Puncak yang muncul pada spektrum sebanyak 12 puncak, dimana satu puncak berlebih pada geseran kima 76,821 – 77,451 ppm merupakan puncak milik pelarut  $\text{CDCl}_3$  yang pada literatur akan muncul pada geseran kimia 77,24 ppm (Jenie *et al*, 2014).

Uji konfirmasi struktur yang terakhir yaitu menggunakan spektroskopi massa. Spektroskopi massa merupakan metode untuk mengukur massa dan berat suatu molekul. Informasi struktural suatu molekul didapatkan dengan melakukan pengukuran massa fragmen yang dihasilkan ketika molekul pecah (McMurry, 2012). Hasil uji spektroskopi massa yang dilakukan pada penelitian ini yaitu terdeteksi 3 fragmen massa. Masing-masing fragmen massa dilakukan uji pustaka pada *database* senyawa kimia untuk mengidentifikasi senyawa yang ditunjukkan pada spektra. Fragmen massa paling besar yaitu 255.0157 m/z diduga merupakan fragmen senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan rumus molekul  $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}]^+$ . Selain itu, dideteksi pula fragmen massa 227.1997 m/z dengan rumus molekul  $[\text{C}_9\text{H}_7\text{ClN}_2\text{OS}]^+$  serta fragmen massa 199,1684 m/z yang diduga merupakan

fragmen dari *3-chlorobenzoylthiocyanate* dengan rumus molekul  $[\text{C}_8\text{H}_4\text{ClNOS}]^+$ . Keduanya memiliki pola fragmentasi *homolytic cleavage* (*alpha cleavage*). *Homolytic cleavage* adalah fragmentasi sederhana dari ion molekuler yang menghasilkan ion elektron genap dan radikal. Proses pemutusan rantai homolitik terjadi ketika radikal dan elektron ganjil (satu elektron tidak berpasangan) dari ikatan yang berdekatan dengan radikal bermigrasi untuk membentuk ikatan antara karbon alfa dan heteroatom atau gugus fungsi tak jenuh, sehingga menyebabkan ikatan sigma putus. Proses ini juga disebut sebagai *alpha cleavage* (Gross, 2017).

Berdasarkan keempat hasil uji konfirmasi struktur yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa senyawa uji memiliki rumus kimia  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$  dengan nama IUPAC 1-*alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea*. Struktur kimia pada senyawa uji dapat dilihat pada Gambar 5.9.

Senyawa turunan tiourea diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, salah satunya sebagai antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Limban *et al* (2011) terhadap senyawa turunan tiourea yakni 2-((4-ethylphenoxy)methyl)benzoylthiourea, telah membuktikan bahwa turunan tiourea mampu berperan sebagai agen antibakteri baru. Turunan tiourea yang mengandung gugus karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) dan tiokarbonil ( $\text{C}=\text{S}$ ) diketahui berperan sebagai ligan donor yang efisien untuk ion logam transisi. Atom donor oksigen, nitrogen, dan belerang dari turunan tiourea memberikan banyak kemungkinan terjadinya ikatan. Aktivitas antibakterinya dapat dijelaskan dengan menghambat *DNA gyrase* dan *Topoisomerase IV* pada sel bakteri (Hashem, *et al.*, 2020). Selain itu, studi yang dilakukan oleh Atiş, *et al*, 2012 terhadap salah satu turunan tiourea, yakni 1-benzoil-3-(5-kloro-2-hidroksifenil)tiourea

turut membuktikan aktivitasnya sebagai antibakteri pada bakteri Gram positif dan negatif.

Tahap berikutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap bakteri *E. coli*. Namun, sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri, perlu dilakukan uji identifikasi bakteri *E. coli* untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan telah sesuai dengan yang diharapkan. Uji identifikasi yang dilakukan antara lain pewarnaan Gram bakteri serta penanaman pada media diferensial dan selektif seperti *MacConkey Agar* (MAC) dan *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB).

Uji pewarnaan bakteri dikerjakan dengan cara memberikan reagen pewarnaan kepada apusan bakteri secara berurutan yang dimulai dari kristal violet, larutan yodium, alkohol sebagai agen penghilang warna, dan safranin. Interpretasi hasil pewarnaan Gram terbagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif yang mempertahankan kristal violet sehingga berwarna ungu, dan bakteri Gram negatif yang kehilangan kristal violet sehingga memunculkan warna merah dari pewarnaan safranin. Terjadinya perbedaan warna pada bakteri Gram positif dan negatif dikaitkan dengan adanya perbedaan pada struktur dan komposisi dinding sel dari kedua kelompok bakteri. Dinding sel bakteri Gram negatif umumnya lebih tipis daripada dinding sel bakteri Gram positif. Selain itu, dinding sel bakteri Gram negatif memiliki kandungan lipid yang lebih banyak daripada bakteri Gram positif. Pemberian alkohol pada bakteri Gram negatif dapat mengekstraksi lipid sehingga meningkatkan porositas atau permeabilitas dinding sel. Dengan demikian, kompleks kristal violet-iodine dapat diekstraksi dan menyebabkan pewarnaan primer pada Gram negatif hilang. Akhirnya, sel-sel ini mengambil warna dari

pewarnaan safranin (Goldman & Green, 2015). Sedangkan pada bakteri Gram positif, komposisi lipid yang lebih rendah menyebabkan terjadi dehidrasi selama pemberian alkohol, sehingga ukuran pori mengecil, sehingga permeabilitasnya berkurang dan kompleks kristal violet-iodine tidak dapat diekstraksi. Oleh karena itu, bakteri Gram positif tetap mempertahankan warna ungu dari kristal violet (Trivedi, *et al.*, 2010). Hasil uji pewarnaan bakteri yang telah diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali, didapatkan bakteri berbentuk batang (basil) dan berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan kelompok bakteri Gram negatif. Hal ini telah sesuai dengan karakteristik *E. coli* yang merupakan bakteri Gram negatif berbentuk basil (Goldman & Green, 2015).

Uji identifikasi yang dilakukan berikutnya yaitu penanaman bakteri uji pada media diferensial dan *sensitive* yaitu MAC. Pemilihan MAC sebagai medium berdasarkan pada literatur yang menyebutkan bahwa MAC mengandung kristal violet dan garam empedu yang mampu menghambat sebagian besar organisme Gram positif. Tak hanya itu, MAC dapat mengandung gula laktosa dan indikator pH yang dapat mengubah koloni fermentor laktosa menjadi merah dan nonfermentor laktosa berwarna putih atau merah muda pucat. *E. coli* menghasilkan lebih banyak asam daripada spesies *coliform* lainnya, sehingga media yang mengelilingi pertumbuhan bakteri juga menjadi merah muda karena asam yang mengendapkan garam empedu, diikuti dengan penyerapan warna merah netral. Selain itu, famili Enterobacteriaceae diketahui akan tumbuh pada MAC dalam 24-48 jam, sedangkan bakteri fermentor yang pemilih dan Gram negatif nonfermentatif dapat memakan waktu hingga 7 hari untuk tumbuh. Berdasarkan pernyataan

tersebut, maka kemampuan suatu organisme untuk tumbuh dan memfermentasi laktosa juga menjadi pertimbangan dipilihnya media ini untuk mengidentifikasi suatu bakteri. *E. coli* merupakan organisme Gram negatif dari famili Enterobacteriaceae yang dapat memfermentasi laktosa, maka dipilih MAC untuk mengidentifikasi senyawa uji (Goldman & Green, 2015; Cappuccino & Welsh, 2017). Hasil uji identifikasi pada media MAC menunjukkan bahwa bakteri uji dapat merubah warna media menjadi merah dan hanya memerlukan waktu 24-48 jam untuk tumbuh. Maka dapat disimpulkan bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif famili Enterobacteriaceae yang mampu memfermentasi laktosa sesuai dengan karakteristik dari *E. coli*.

Tahap uji identifikasi yang terakhir dilakukan adalah penanaman bakteri uji pada media EMB. Media EMB termasuk dalam media diferensial dan juga selektif. Media ini mengandung laktosa, pewarna eosin dan metilen biru yang memungkinkan terjadinya diferensiasi antara fermentor laktosa enterik dan nonfermentor. Pewarna eosin dan metilen biru dalam media ini juga dapat menghambat sebagian pertumbuhan organisme Gram positif, sehingga pertumbuhan Gram negatif menjadi lebih berlimpah. Media ini pun dapat mengidentifikasi *E. coli* pada usus besar. Koloni *E. coli* akan berwarna biru kehitaman dengan kilau hijau metalik yang disebabkan oleh banyaknya asam yang dihasilkan, dimana asam ini dapat mengendapkan pewarna eosin dan metilen biru ke permukaan pertumbuhan bakteri (Cappuccino & Welsh, 2017). Hasil bakteri uji yang diikultur pada media EMB yaitu terdapat koloni bakteri yang tumbuh berwarna biru kehitaman dengan hijau metalik (*green metallic sheen*). Tumbuhnya bakteri uji dalam media EMB membuktikan

bahwa bakteri merupakan bakteri Gram negatif yang termasuk dalam karakteristik *E. coli*. Selain pertumbuhan, warna yang dihasilkan pada bakteri uji pun menunjukkan bahwa bakteri uji memiliki kemampuan untuk memfermentasi laktosa. Maka bakteri uji dapat diidentifikasi sebagai bakteri *E. coli*.

Berdasarkan ketiga uji identifikasi yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa bakteri uji yang digunakan merupakan isolat bakteri *E. coli*. Hal ini dikarenakan semua uji identifikasi yang dilakukan memberikan hasil yang sesuai dengan karakteristik *E. coli* pada literatur. Karakteristik *E. coli* antara lain merupakan bakteri Gram negatif yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae dengan kemampuan memfermentasi laktosa.

Setelah dilakukan uji identifikasi bakteri, selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri senyawa uji 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223. Pertimbangan dalam penggunaan isolat urin daripada ATCC yaitu karena isolat diambil dari urin pasien ISK yang telah menggunakan berbagai macam antibakteri, sehingga memungkinkan bakteri dari isolat urin pasien ISK lebih resisten terhadap antibakteri daripada ATCC (Mohammadinia *et al.*, 2012). Sementara itu, metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini adalah metode dilusi agar. Metode dilusi (baik agar maupun cair) memungkinkan penilaian kuantitatif kerentanan antimikroba dengan menentukan konsentrasi agen terendah yang mampu pertumbuhan organisme uji, yang digambarkan sebagai konsentrasi hambat minimum (KHM). Namun, pemilihan metode dilusi agar pada penelitian ini yakni atas dasar pertimbangan bentuk senyawa uji yang merupakan suspensi. Pada dilusi agar, senyawa dalam bentuk suspensi akan lebih mudah terdispersi

secara seragam ke dalam agar. Sedangkan pada dilusi cair seringkali terjadi kesulitan dalam menentukan KHM karena masalah dispersi senyawa yang tidak larut dalam media pertumbuhan cair, sehingga mengganggu kekeruhan pertumbuhan bakteri. Keuntungan lain dari metode dilusi agar dapat dilihat dari kemampuan bakteri untuk membentuk pertumbuhan yang dapat dideteksi dengan mata telanjang (Golus *et al.*, 2016). Media pertumbuhan bakteri yang digunakan yaitu *Mueller-Hinton Agar* (MHA). MHA merupakan media non-diferensial dan non-selektif yang memiliki reproduktifitas media yang baik. MHA diproduksi dengan kandungan timin dan timidin yang rendah serta kadar kalsium dan magnesium yang terkontrol (Zimbro *et al.*, 2009). Selain itu, MHA juga mengandung *starch* yang berfungsi untuk menyerap racun yang dikeluarkan oleh bakteri, sehingga tidak mengganggu antibiotik dan dapat menghasilkan pertumbuhan patogen yang cepat dan baik (NELS, 2018).

Dilusi agar dilakukan dengan mencampurkan senyawa uji dengan MHA kemudian ditetesi biakan bakteri dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/mL. Senyawa pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik gentamisin, sedangkan untuk kontrol bakteri digunakan tween 80 0,4%. Pemilihan tween 80 0,4% didapatkan dari hasil optimasi pelarut senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang dianggap paling ideal dalam penelitian ini. Berdasarkan hasil uji pada senyawa pembanding terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1 ppm dan terjadi penghambatan pada konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 8 ppm, dan 16 ppm. Maka didapatkan KHM dari senyawa gentamisin adalah 2 ppm. Pada CLSI (2017), dikatakan bahwa famili *Enterobacteriaceae* dikatakan sensitif gentamisin dengan nilai KHM  $\leq 4$  ppm, dan dikatakan resisten bila  $\geq 16$  ppm. Hal ini menunjukkan bahwa isolat urin

*E. coli* 1223 sensitif terhadap antibiotik gentamisin sesuai dengan literatur yang ada (CLSI, 2017). Pada kontrol bakteri masih terlihat adanya pertumbuhan bakteri, sehingga dapat disimpulkan bahwa tween 80 0,4% tidak dapat menghambat atau mempengaruhi pertumbuhan bakteri ataupun menyebabkan *false positive*. Sementara itu, hasil dilusi agar pada senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea menunjukkan bahwa bakteri tetap tumbuh pada tiap konsentrasi yang digunakan (7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm), sehingga dapat disimpulkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak dapat menghambat pertumbuhan isolat urin *E. coli* 1223.

Berdasarkan hasil yang didapat, hilangnya aktivitas senyawa sebagai antibakteri dapat ditinjau dari modifikasi struktur yang membuat senyawa mungkin kurang lipofilik. Senyawa dengan efek lipofilik yang rendah dapat menurunkan aktivitasnya sebagai antibakteri. Umumnya, suatu senyawa memiliki aktivitas biologis optimal yang bervariasi dari satu organisme ke organisme lain bergantung pada perbedaan struktur dinding sel mereka. Oleh karena itu, panjang rantai alkil dari suatu senyawa memberikan efek yang berbeda pada tiap-tiap organisme. Pada penelitian yang dilakukan oleh El Hage, *et al* (2014), senyawa dengan panjang rantai C<sub>14</sub> dan C<sub>16</sub> menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif. Hal ini didukung oleh Salajkova, *et al* (2020) yang menyatakan bahwa bioaktivitas optimal ditunjukkan oleh rantai C<sub>12</sub> – C<sub>14</sub> untuk Gram positif, dan rantai C<sub>14</sub> – C<sub>16</sub> untuk bakteri Gram negatif. Sementara itu, senyawa dengan panjang rantai yang lebih pendek dinilai lebih aktif melawan ragi dan jamur, sedangkan organisme dengan gram negatif merupakan organisme yang



paling rentan terhadap senyawa yang paling lipofilik. Hal ini dapat disebabkan oleh sifat lipofilik yang dimiliki oleh dinding sel Gram negatif, sehingga molekul yang hidrofilik lebih sulit untuk melintasinya (El Hage, *et al.*, 2014). Dengan demikian, dapat dilakukan perpanjangan rantai alkil pada senyawa 1-*alil*-3-(3-klorobenzoil)tiourea untuk meningkatkan sifat lipofiliknya, karena panjang rantai alkil pada senyawa ini masih tergolong pendek ( $C_{11}$ ) sehingga lipofilisitas senyawa masih rendah.

Selain kurangnya lipofilisitas pada senyawa, efek elektronik yang rendah turut mendukung hilangnya aktivitas antibakteri dari senyawa. Dalam penelitian ini, dilakukan penambahan halogen yakni Cl pada posisi *meta*- di cincin benzena. Substitusi halogen pada posisi *meta*- mempengaruhi efek elektronik berdasarkan elektronegativitasnya. Peningkatan efek elektronik dapat dilakukan dengan mengganti substitusi kloro dengan atom lain pada golongan halogen yang memiliki elektronegativitas lebih tinggi daripada klor, yaitu *fluor*. Golongan halogen merupakan golongan dengan keelektronegatifan yang tinggi, dimana fluor memiliki elektronegativitas yang paling tinggi diantara halogen lain ( $F > Cl > Br > I$ ). Selain itu, *fluor* memiliki kekuatan ikatan yang paling besar dengan karbon, dapat meningkatkan sifat hidrofobik, dan memiliki polarisasi yang rendah (Ghorab, *et al.*, 2017).

Berikutnya, substitusi suatu gugus ke cincin benzena (misalnya: halogen pada posisi *meta*-) dapat mempengaruhi efek sterik menjadi terlalu besar yang menimbulkan hambatan sterik yang besar. Hal ini dapat dikarenakan efek jari-jari atom pada substiten halogen yang mengalami peningkatan sejalan dengan peningkatan masing-masing berat molekulnya ( $F < Cl < Br < I$ ) (Jia, *et al.*, 2019). Ukuran atom klor yang lebih besar dari fluor

memberikan pengaruh yang signifikan terhadap gaya dispersi London. Atom atau molekul yang lebih besar dan lebih berat memiliki gaya dispersi yang lebih besar, begitupun sebaliknya, pada atom atau molekul dengan ukuran yang lebih kecil, gaya dispersi yang ditimbulkan pun semakin lemah. Ketika gaya dispersi London meningkat, bagian tiourea menjadi tidak planar karena terjadi gaya tarik-menarik antarmolekul yang menghalangi *active-site* dari senyawa dan *reseptor-site* pada bakteri untuk berikatan satu sama lain (Fakhar, *et al.*, 2018; Misral, *et al.*, 2018). Oleh karena itu, pergantian substitusi Cl dengan substitusi F yang memiliki jari-jari atom lebih kecil dapat mengurangi hambatan sterik yang diberikan, sehingga dapat meningkatkan aktivitasnya sebagai antibakteri (Ghorab, *et al.*, 2017).

## 6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Implikasi penelitian ini terhadap bidang kefarmasian adalah dapat dijadikan sebagai referensi dasar dalam pengembangan obat baru ataupun acuan dalam suatu penelitian terhadap suatu senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri untuk mengatasi permasalahan resistensi antibiotik terhadap *E. coli*.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini yaitu senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang terbentuk sangat sedikit dan terbatas, sehingga diperlukan pertimbangan yang tepat dan kehati-hatian dalam pengerjaan agar senyawa yang diperoleh dapat digunakan dengan efisien. Selain itu, senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea merupakan senyawa nonpolar yang sukar larut

dalam air, sehingga senyawa harus dibuat dalam bentuk suspensi menggunakan tween 80.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian sintesis dan uji aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223 ini adalah :

1. Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik antara aliltiourea dengan 3-klorobenzoil klorida
2. Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap isolat urin *Escherichia coli* 1223 yang ditunjukkan dengan tidak adanya penghambatan pertumbuhan bakteri pada seluruh konsentrasi yang digunakan.
3. Data KHM senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea tidak dapat ditentukan sehingga tidak dapat dibandingkan dengan KHM antibiotik gentamisin.

#### 7.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, maka saran yang dapat diberikan adalah :

1. Perlu dilakukan perpanjangan rantai alkil hingga panjang rantai mencapai  $C_{14}$ – $C_{16}$  untuk meningkatkan efek lipofilik senyawa terhadap bakteri Gram negatif
2. Perlu dilakukan pergantian substitusi halogen dari Cl menjadi F untuk meningkatkan efek elektronik dan mengurangi hambatan sterik yang ditimbulkan

3. Melakukan uji *in silico* terlebih dahulu terhadap senyawa uji untuk mengetahui potensinya sebagai antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, 2003. *Prinsip-Prinsip Kimia Modern*. Jakarta: Erlangga.
- Adnan, M. Iuthfi., 2019. Wanita Usia 26 Tahun, Multigravida Hamil 25 Minggu Dengan Diagnosis Infeksi Saluran Kemih', *jurnal Jimki*, 7(2), pp. 54–59.
- Agrawal, P., 2015. Pharmacovigilance Structure-Based Drug Design', (May), pp. 3–5. doi: 10.4172/2329-6887.1000e111.
- Alanazi, M. Q., Alqahtani, F. Y. and Aleanizy, F. S., 2018. An evaluation of E. coli in urinary tract infection in emergency department at KAMC in Riyadh, Saudi Arabia: Retrospective study', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12941-018-0255-z.
- Aminah, J. M. 2015. Multidrug Resistant *Escherichia coli* Pada Sumber Air Minum di Kota Tangerang. *Jurnal Medikes*, Volume 3, Edisi 11, pp. 31-41.
- Ana, K. D., Riwayati, N. Y. and Jayanti, S. F., 2020. 'Hubungan Lama Pemasangan Kateter Dengan Kejadian Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Di Ruang Penyakit Dalam Rumkit Tk li Dr. Soepraoen Malang', *Care : Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, 8(2), p. 138. doi: 10.33366/jc.v8i2.1213.
- Aparoy, P., Reddy, K. K. & Reddana, P., 2012. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5-LOX Inhibitors. *Current Medical Chemistry*, 19(18), pp. 3763-3778.
- Arslan, H. *et al.*, 2009. Antimicrobial activity of some thiourea derivatives and their nickel and copper complexes, *Molecules*, 14(1), pp. 519–527. doi: 10.3390/molecules14010519.

- Arvivo, Debi & Dwiningtyas, Ai Winarti. 2017. Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap *Escherichia coli* Penyebab Infeksi Saluran Kemih. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, Volume 4.
- Atiş, M. *et al.*, 2012. Structural, antimicrobial and computational characterization of 1-benzoyl-3-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)thiourea, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98, pp. 290–301. doi: 10.1016/j.saa.2012.08.020.
- Baban, S. T., 2017. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection among Infants and Young Children in Erbil City, (August 2017), pp. 0–22. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/319130632\\_Prevalence\\_and\\_Antimicrobial\\_Susceptibility\\_Pattern\\_of\\_Extended\\_Spectrum\\_Beta-Lactamase\\_Producing\\_Escherichia\\_coli\\_Isolated\\_from\\_Urinary\\_Tract\\_Infection\\_among\\_Infants\\_and\\_Young\\_Children\\_in\\_Erbil\\_City](https://www.researchgate.net/publication/319130632_Prevalence_and_Antimicrobial_Susceptibility_Pattern_of_Extended_Spectrum_Beta-Lactamase_Producing_Escherichia_coli_Isolated_from_Urinary_Tract_Infection_among_Infants_and_Young_Children_in_Erbil_City).
- Balloux, F. and van Dorp, L., 2017. Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us?, *BMC Biology*, 15(1), pp. 4–9. doi: 10.1186/s12915-017-0433-z.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S. K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Bele, Archana A. & Khale, Anubha. 2011. An overview on Thin Layer Chromatography. *Ijpsr*, 2(2), pp. 256-267. Available at: [www.ijpsr.com](http://www.ijpsr.com).

- Bello, O. A. *et al.*, 2018. Pharmacognosy Reviews, 1(2), pp. 8–15. doi: 10.4103/phrev.phrev.
- Bielenica, A. *et al.*, 2018. Synthesis, structural and antimicrobial studies of type II topoisomerase-targeted copper(II) complexes of 1,3-disubstituted thiourea ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 182(li), pp. 61–70. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.005.
- Boyles, T. H. and Wasserman, S., 2015. Diagnosis of bacterial infection', *South African Medical Journal*, 105(5), pp. 419–421. doi: 10.7196/SAMJ.9647.
- Brito, T. O. *et al.*, 2018. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation', *Medicinal Chemistry*, 16(1), pp. 93–103. doi: 10.2174/1573406415666181208110753.
- Black, J. G., 2008. *Microbiology Principles and Explorations*. 7th penyunt. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc.
- Brittain, C. G., 2009. Using Melting Point to Determine Purity of Crystalline Solids, *University of Rhode Island*, pp. 1–2. Available at: [http://www.chm.uri.edu/mmcgregor/chm228/use\\_of\\_melting\\_point\\_apparatus.pdf](http://www.chm.uri.edu/mmcgregor/chm228/use_of_melting_point_apparatus.pdf).
- Bruckner, Reinhard., 2010. *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*. Berlin: Springer.
- Cai, L. 2014. Thin layer chromatography. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, pp. 6.3.1-6.3.18. doi: 10.1002/9780470089941.et0603s08.
- Cappuccino, J. G. & Welsh, C., 2017. *Microbiology A Laboratory Manual*. 11<sup>th</sup> penyunt. London: Pearson Education Limited 2018 .



- Carroll, K. C. and Hobden, J. A., 2016. Pathogenesis of Bacterial Infection', *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, (April 2016), pp. 153–168.
- Chaves, B. J. & Tadi, P., 2021. *NCBI*. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/> [Diakses 4 March 2021].
- Chikezie, I. O., 2017. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method, *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), pp. 977–980. doi: 10.5897/ajmr2017.8545.
- Chooramani, G., Jain, B. and Chauhan, P. S., 2020. Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern of bacteria causing urinary tract infection; study of a tertiary care hospital in North India', *Clinical Epidemiology and Global Health*, 8(3), pp. 890–893. doi: 10.1016/j.cegh.2020.02.018.
- Clayden, J., Greeves, N. & Warren, S., 2012. *Organic Chemistry*. 2nd penyunt. New York : Oxford University Press .
- CLSI., 2017. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI Document M100-S27.*, *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.* Available at: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Daly, Seth M., Sturge, Carolyn R., & Greenberg, David E. 2017. Inhibition of Bacterial Growth by Peptide-Conjugated Morpholino Oligomers. *Methods Mol Biol*, 1565: 115-122. doi: 10.1007/978-1-4939-6817-6\_10.

- Deore, A. B. *et al.*, 2019. The Stages of Drug Discovery and Development Process, *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6), pp. 62–67. doi: 10.22270/ajprd.v7i6.616.
- El Hage, S. *et al.* 2014. Synthesis, antimicrobial activity and physico-chemical properties of some n-alkyldimethylbenzylammonium halides. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(4), pp. 245-253. doi: 10.1016/j.jab.2014.02.002.
- Elliot, T., Casey, A., Lambert, P. & Sandoe, J., 2011. *Medical Microbiology and Infection Lecture Notes*. 5th penyunt. Hoboken: Blackwell Publishing Ltd.
- Fakhar, I. *et al.* 2018. Synthesis and binding behaviour of new isomers of bis-Thiourea. *Sains Malaysiana*, 47(6), pp. 1199-1208. doi : 10.17576/jsm-2018-4706-15.
- Flores-Mireles, A. L. *et al.*, 2015. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), pp. 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432.
- Frey. Frank M. & Meyers, Ryan. 2010. Antibacterial activity of traditional medical plants used by Haudenosaunee peoples of New York State. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), p. 64. doi: 10.1186/1472-6882-10-64.
- Forestryana, D. & Arnida. 2020. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, pp. 113-124.
- Ghorab, M. M. *et al.* 2017. Antimicrobial and anticancer activity of some novel fluorinated thiourea derivatives carrying sulfonamide moieties: Synthesis,

- biological evaluation and molecular docking. *Chemistry Central Journal*, 11(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/s13085-017-0258-4.
- Goldman, E. & Green, L. H., 2015. *Practical Handbook of Microbiology*. 3rd penyunt. New York : CRC Press.
- Golus, J. *et al.*, 2016. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), pp. 1291–1299. doi: 10.1111/jam.13253.
- Gross, Jürgen H. 2017. *Mass Spectrometry A Textbook 3<sup>rd</sup> Edition*. Springer: Switzerland.
- Hart, H. *et al.*, 2012. CH 2270 / 2290 Melting Point Determination Materials From the Chemicals Hood : Nothing from the Stockroom Cinnamic acid Benzilic acid Fluorene Benzoic acid Salicylic acid, pp. 1–4.
- Hashem, H. E., Amr, A. E.-G. E., Nossier, E. S. & Elsayed, E. A., 2020. Synthesis, Antimicrobial Activity and Molecular Docking of Novel Thiourea Derivatives Tagged with Thiadiazole, Imidazole and Triazine Moieties as Potential DNA Gyrase and Topoisomerase IV Inhibitors. *Molecules* , Volume 25, p. 2766.
- Hashinamoto, S. & Shime, N. 2013. Evaluation of semi-quantitative scoring of Gram staining or semi-quantitative culture for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia: A retrospective comparison with quantitative culture. *Journal of Intensive Care*, 1(1), pp. 1-5. doi: 10.1186/2052-0492-1-2.

- Hiremath, P. S. and Bannigidad, P. 2011. Automated Gram-staining characterisation of bacterial celss using colour and cell wall properties. *International Journal of Biomedical Engineering and Technologi*, 7(3), pp. 257-265. doi: 10.1504/IJBET.2011.043298.
- Jafarian, A. H., Tasbandi, A. and Mohammad Roshan, N. 2018. Evaluation of photoshop based image analysis in cytologic diagnosis of pleural fluid in comparison with conventional modalities. *Diagnostic Cytopathology*, 46(7), pp. 578-583. doi: 10.1002/dc.23952.
- Jenie, U. A. et al., 2014. *Teknik Modern Spektroskopi NMR: Teori dan Aplikasi dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik*. Jakarta: LIPI Press.
- Jia, F. et al. (2019). The effect of halogenation on the antimicrobial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity and proteolytic stability of the antimicrobial peptide Jelleine-I. *Peptides*, 112, pp. 56-66. doi: 10.1016/j.peptides.2018.11.006.
- Jiang, L., 2011. Comparison of Disk Diffusion , Agar Dilution , and Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of Five Chitosans, Fujian Agriculture and Forestry University, China, pp. 24-27, *Fujian Agriculture and Forestry University, China*, (August), pp. 24–27.
- Kassakian, S. Z. and Mermel, L. A., 2014. Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria', *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 3(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/2047-2994-3-9.
- Khan, S. A. et al., 2018. Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization,

*Handbook of Materials Characterization*, pp. 317–344. doi: 10.1007/978-3-319-92955-2\_9.

Klein, David. 2015. *Organic Chemistry 2<sup>nd</sup> Edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Kumar, S., Jyotirmayee, K. and Sarangi, M., 2013. Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1), pp. 126–132.

Kurt, G., Sevgi, F. and Mercimek, B., 2009. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of new benzoylthiourea ligands, *Chemical Papers*, 63(5), pp. 548–553. doi: 10.2478/s11696-009-0055-1.

Lee, C. H., Huang, H. C. and Juan, H. F., 2011. Reviewing ligand-based rational drug design: The search for an ATP synthase inhibitor, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), pp. 5304–5318. doi: 10.3390/ijms12085304.

Li, F., Weir, M. D. and Xu, H. H. K., 2013. Effects of quaternary ammonium chain length on antibacterial bonding agents, *Journal of Dental Research*, 92(10), pp. 932–938. doi: 10.1177/0022034513502053.

Limban, C. *et al.* 2011. Synthesis and antimicrobial properties of new 2-((4-ethylphenoxy)methyl)benzoylthioureas. *Chemical Papers*, 65(1), pp. 60–90. doi: 10.2478/s11696-010-0092-9.

Malík, I. *et al.*, 2012. Antimicrobial activity of meta-alkoxyphenylcarbamates containing substituted N-phenylpiperazine fragment, *Brazilian Journal of*

*Microbiology*, 43(3), pp. 959–965. doi: 10.1590/S1517-83822012000300016.

Martinez de Tejada, G. *et al.*, 2012. Bacterial Cell Wall Compounds as Promising Targets of Antimicrobial Agents I. Antimicrobial Peptides and Lipopolyamines, *Current Drug Targets*, 13(9), pp. 1121–1130. doi: 10.2174/138945012802002410.

Meyerholz, D. K. & Beck, A. P. 2018. Fundamental Concepts for Semi-quantitative Tissue Scoring in Translational Research. *ILAR Journal*, 59(1), pp. 13-17. doi: 10.1093/ilar/ily025.

McMurry, J., 2012. *Organic Chemistry 8<sup>th</sup>*. Belmont: Brooks/Cole.

Mohammadinia, M. *et al.*, 2012. Contact lens disinfecting solutions antibacterial efficacy: Comparison between clinical isolates and the standard ISO ATCC strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *Eye*, 26(2), pp. 327–330. doi: 10.1038/eye.2011.284.

Musdalipah, 2018. Identifikasi Drug Related Problem (Drp) pada Pasien Infeksi Saluran Kemih, *Jurnal Kesehatan*, 1(1), pp. 1–12.

Nakamura, S. and Minamino, T., 2019. Flagella-driven motility of bacteria, *Biomolecules*, 9(7). doi: 10.3390/biom9070279.

NELS, 2018. *Technical Product Information*, Winslow: Northeast Laboratory Services.

Pavia, D. L., Lampman, G. M. and Kriz, George S. 2009. *Introduction to Spectroscopy 3<sup>rd</sup> Edition*. London: Brooks/Cole Thomson Learning.

Prakash, N. & Devina, P., 2010. Drug Discovery. *Journal of Antivirals &*

*Antiretrovirals*, 2(4), pp. 063-068.

Ramlakhan, S. *et al.*, 2014. Clinical Options for the Treatment of Urinary Tract Infections in Children, *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*, 8, p. CMPed.S8100. doi: 10.4137/cmped.s8100.

Rath, S. *et al.*, 2014. Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), pp. 140–149. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60331-5.

Retnaningsih, A., Primadhamanti, A. and Marisa, I., 2019. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Biji Pepaya Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae* dengan Metode Difusi Sumuran', *Jurnal Analisis Farmasi*, 4(2), pp. 122–129.

Riswiyanto, 2015. *Kimia Organik Edisi Kedua*. Jakarta : Erlangga.

Safrizal, M. and Harjoko, A. 2013. Perbandingan Pewarnaan Citra Greyscale Menggunakan Metode K-Means Clustering dan Agglomerative Hierarchical Clustering. *Bimipa*, 23(3), pp. 255-263.

Salajkova, S. *et al.* 2020. Wide-Antimicrobial Spectrum of Picolinium Salts. *Molecules*, 25(9), pp. 1-16. doi: 10.3390/molecules25092254.

Salas-Mera, D. *et al.*, 2017. Gentamicin resistant *E. coli* as a cause of urinary tract infections in children, *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*, 35(7), pp. 465–466. doi: 10.1016/j.eimce.2016.11.003.

Serwecinska, L. 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria. *MPDI Water*, 12, pp. 1-7.

- Shahid, M. and Cooke, R. 2007. Is a once daily dose of gentamicin safe and effective in the treatment of UTI in infants and children?. *Archives of Disease in Childhood*, 92(9), pp. 823-824. doi: 10.1136/ad.2007.121079.
- Shalas, A. F., Siswandono and Rudyanto, M., 2016. Synthesis and structure-activity relationship of 1-allyl-3-(2-chlorobenzoyl) thiourea as analgesic, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(6), pp. 297–298.
- Shalas, A. F., Siswandono and Rudyanto, M., 2018. Synthesis and Pain inhibition activity of the analogs of 1-allyl-3-benzoylthiourea for new analgesic lead compound discovery, *Journal of Young Pharmacists*, 10(1), pp. 12–15. doi: 10.5530/jyp.2018.10.4.
- Siswandono & Soekardjo, 2000. *Kimia Medisinal I dan II*. Surabaya: Airlangga Press.
- Skoog, D. A., Weat, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R., 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th penyunt. Belmont : Brooks/Cole.
- Suhartati, T., 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-VIS dan Spektrofotometro Massa Untuk Penentuan Struktur Organik*. Bandar Lampung : AURA .
- Sulistiyani, M., 2017. Optimasi Pengukuran Spektrum Vibrasi Sampel Protein Menggunakan Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red (Ftir), *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), pp. 173–180.
- Sutiknowati, L. I., 2016. Bioindikator Pencemar, Bakteri Escherichia coli, *Jurnal Oseana*, 41(4), pp. 63–71. Available at: oseanografi.lipi.go.id.
- Thairu, Y., Usman, Y. and Nasir, I., 2014. Laboratory perspective of gram staining



- and its significance in investigations of infectious diseases, *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), p. 168. doi: 10.4103/2384-5147.144725.
- Titilawo, Y., Obi, L. and Okoh, A., 2015. Antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates recovered from some rivers in Osun State, South-Western Nigeria: Implications for public health, *Science of the Total Environment*, 523, pp. 82–94. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.095.
- Toledo, M., 2015. UV / VIS Spectrophotometry, *Mettler-Toledo International*, (September 2015), pp. 4–14.
- Trivedi, P. C., Pandey, S. & Bhadauria, S., 2010. *Text Book of Microbiology*. Jaipur: Aavishkar Publishers, Distributors .
- Ullah, H. and Ali, S., 2017. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions, *Antibacterial Agents*. doi: 10.5772/intechopen.68695.
- Umam, F. U., 2019. Pemurnian Garam dengan Metode Rekristalisasi di Desa Bunder Pamekasan untuk Mencapai SNI Garam Dapur, *Jurnal Ilmiah Pangabdhi*, 5(1). doi: 10.21107/pangabdhi.v5i1.5161.
- Utomo, S. B. *et al.*, 2017. Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Analgesik Senyawa Turunan Meperidin Menggunakan Metode Semiempiris AM1, *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*, 2(3), pp. 158–168.
- Von Wuffen, J. *et al.* 2012. Transition of an anaerobic *Escherichia coli* culture to aerobiosis: Balancing mRNA and protein levels in a demand-directed dynamic flux balance analysis. *PLoS ONE*, 11(7), 00. 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0158711
- Waller, D. G. and Sampson, A. P., 2018. Chemotherapy of infections, *Medical*

*Pharmacology and Therapeutics*, pp. 581–629. doi: 10.1016/b978-0-7020-7167-6.00051-8.

Wang, Zerong., 2010. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. USA : John Wiley & Sons, Inc.

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature Protocols*, 3(2), pp. 163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton & I, C., 2014. *Prescott's Microbiology*. 9th penyunt. New York : McGraw-Hill.

Woodward, S., 2015. E. coli: A brief overview, *British Journal of Nursing*, 24(3), pp. 158–159. doi: 10.12968/bjon.2015.24.3.158.

World Organisation of Animal Health, 2012. Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing, *OIE Terrestrial Manual*, pp. 1–11. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/GUIDE\\_2.1\\_ANTIMICROBIAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf).

Wulandari, L., 2011. *Kromatografi Lapis Tipis, Taman Kampus Presindo*.

Yang, W. et al., 2012. Synthesis, structures and antibacterial activities of benzoylthiourea derivatives and their complexes with cobalt, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, pp. 97–105. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.08.001.

Young, J. C., 2013. True Melting Point Determination, *Chemical Educator*, 18(2),

p. 208. doi: 10.1333/s00897132500a.

Zarfel, G. *et al.*, 2013. Comparison of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection, *Environmental Pollution*, 173, pp. 192–199. doi: 10.1016/j.envpol.2012.09.019.

Zhang, S. *et al.*, 2015. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes, *Chemosphere*, 135, pp. 138–145. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.001.

Zimbro, M. J. *et al.*, 2009. *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*, Citeseer. doi: 10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Perhitungan Jumlah Bahan untuk Sintesis

Aliltiourea : Benzoilklorida (derivat) : Trietilamin (TEA) = 1,2 : 1 : 2

BAHAN	Mr	DENSITAS ( $\rho$ )	JUMLAH MOL
Aliltiourea	116,18 g/mol	1,110 g/mL	0,024 mol
3-klorobenzoil klorida	175,01 g/mol	1,367 g/mL	0,02 mol
Trietilamin (TEA)	101,19 g/mol	0,726 g/mL	0,04 mol

Berdasarkan hasil data diatas, maka dibutuhkan jumlah bahan sebanyak:

a. Aliltiourea :  $\text{mol} \times \text{Mr} = 0,024 \text{ mol} \times 116,18 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2,7883 \text{ gram}$

b. 3-klorobenzoil klorida :  $\text{mol} \times \text{Mr} = 0,02 \text{ mol} \times 175,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3,5002 \text{ gram}$

3-klorobenzoil klorida tersedia dalam bentuk cair, sehingga volume yang

dibutuhkan adalah :  $\frac{\text{massa}}{\rho} = \frac{3,5002 \text{ gram}}{1,367 \text{ gram/mL}} = 2,561 \text{ mL}$

c. Trietilamin (TEA) :  $\text{mol} \times \text{Mr} = 0,04 \text{ mol} \times 101,9 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 4,0476 \text{ gram}$

Trietilamin tersedia dalam bentuk cair, sehingga volume yang dibutuhkan

adalah :  $\frac{\text{massa}}{\rho} = \frac{4,0476 \text{ gram}}{0,726 \text{ gram/mL}} = 5,575 \text{ mL}$

## Lampiran 2. Perhitungan Hasil Sintesis

### 1. Serbuk produk hasil sintesis senyawa BATU-3

- Massa teoritis serbuk = mol x Mr  
= 0,02 mol x 254,74 gram/mol  
= 5,0948 gram
- Massa produk hasil = 1,5598 gram

### 2. Persen rendemen kristal BATU-3 dari rekristalisasi serbuk BATU-3

- Massa kristal terbentuk =
- Kristal yang ditimbang =

$$\text{Rumus \%Rendemen Kristal} = \frac{\text{Massa kristal yang terbentuk}}{\text{Massa kristal yang ditimbang}} \times 100\%$$

Rekristalisasi Ke-	Massa Serbuk yang Ditimbang (gram)	Massa Kristal yang Terbentuk (gram)	%Rendemen Kristal
1	0,3005	0,2040	
2	0,2004	0,1941	
3	0,0600	0,0440	
4	0,1168	0,0887	
5	0,0572	0,0437	
6	0,0739	0,0604	
<b>Total</b>	<b>0,8088 g</b>	<b>0,6349 g</b>	$\frac{0,6349}{0,8088} \times 100\% = 78,4990\%$

### Lampiran 3. Surat Bukti Kelayakan Etik



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755  
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : [sekr.fk@ub.ac.id](mailto:sekr.fk@ub.ac.id)

**KETERANGAN KELAikan ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 48 / EC / KEPK / 02 / 2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Sintesis, Uji Aktivitas Antibakteri, dan *Docking Molecular* Senyawa Turunan 1-Alil-3-Benzothiourea.

**PENELITI UTAMA** : Alvan Febrian Shalas, M.Farm., Apt

**ANGGOTA** :

- |   |                          |                         |
|---|--------------------------|-------------------------|
| 1. Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt            | 8. I'id Wahidatul K.     | 15. Jauharoh Nabilah    |
| 2. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm, M.Farm., Apt | 9. Rory Anggi Okta S.    | 16. Rachmad Rizky D.    |
| 3. Kadek Devi Arum Savitri                            | 10. Fiina Prasetya L.    | 17. Era Wiloka          |
| 4. Nada Arum Wardhani                                 | 11. Fadilah Maulana I.A  | 18. Kevin Nauval Karim  |
| 5. Nurlita Dwi Rahmanigita                            | 12. Natalie Dhera D.K    | 19. Hanif Syafa'atur R. |
| 6. Imroatul Hasanah                                   | 13. Veren Kurnia Putri   |                         |
| 7. Muhammad Fahmi H.                                  | 14. Azatil Ismah Firdaus |                         |

**UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

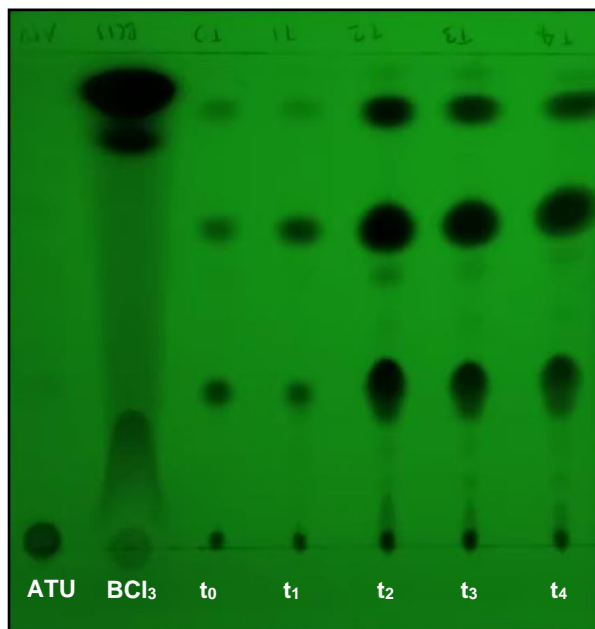
Malang,  
Ketua,



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, Sp.S, Sp.BS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)  
NIPK. 20180246051611001

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

**Lampiran 4. Dokumentasi Hasil Sintesis****1. Hasil optimasi waktu sintesis dengan KLT tiap jam****2. Hasil evaporasi senyawa berbentuk pasta kental berwarna kuning pekat**

**3. Hasil uji KLT pencucian dengan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )**

**a. Sebelum pencucian  $\text{Na}_2\text{CO}_3$**



**b. Setelah pencucian  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  selama 2 jam pertama**

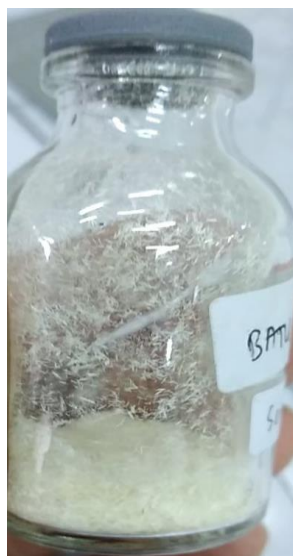




c. Setelah pencucian  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  selama 6 jam



4. Hasil serbuk setelah dikeringkan



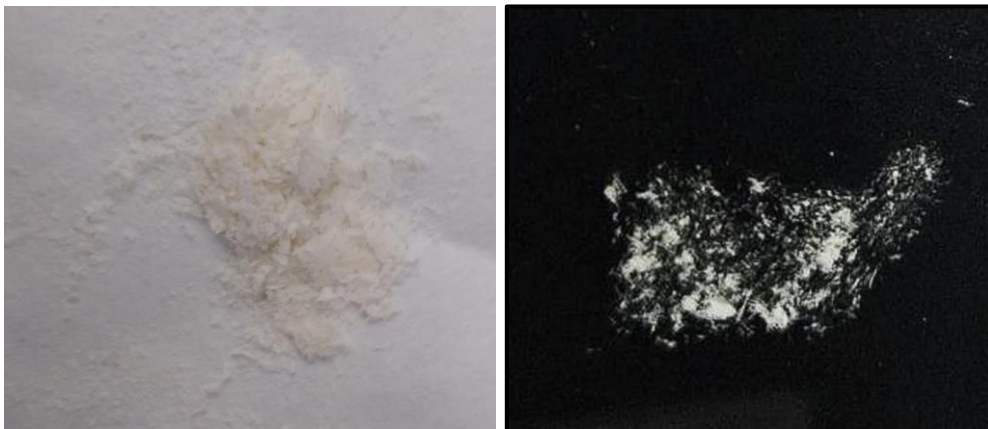
## 5. Hasil rekristalisasi



(a) Uji KLT rekristalisasi



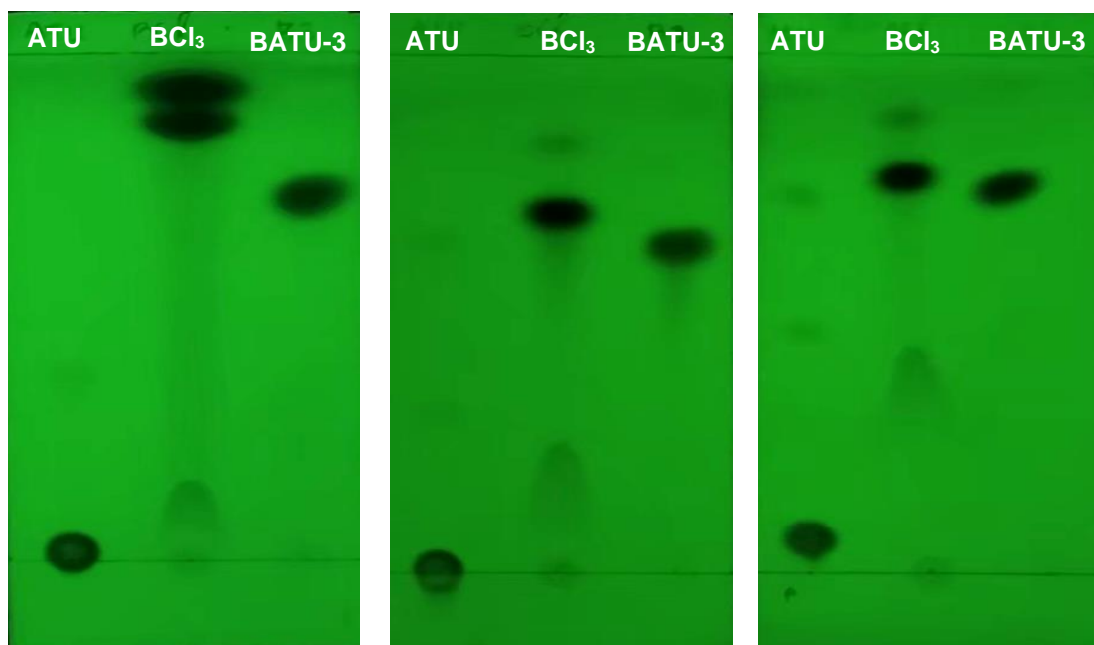
(b) Kristal yang terbentuk sebelum disaring



(c) Kristal yang telah disaring dan dikeringkan

## Lampiran 5. Hasil Uji Kemurnian Kristal BATU-3

### 1. Hasil uji kemurnian kristal BATU-3 dengan metode KLT



(a) Fase gerak N-heksana:  
Kloroform : Etil asetat  
(8 : 3 : 1)

(b) Fase gerak N-hek-  
sana : Etil asetat  
(5 : 1)

(c) Fase gerak N-hek-  
sana : THF  
(2 : 1)

Keterangan:

ATU : Aliltiourea

BCl<sub>3</sub> : Benzoiklorida

BATU-3 : 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

### 2. Hasil uji kemurnian kristal BATU-3 dengan metode rentang titik lebur

#### a. Replikasi-1



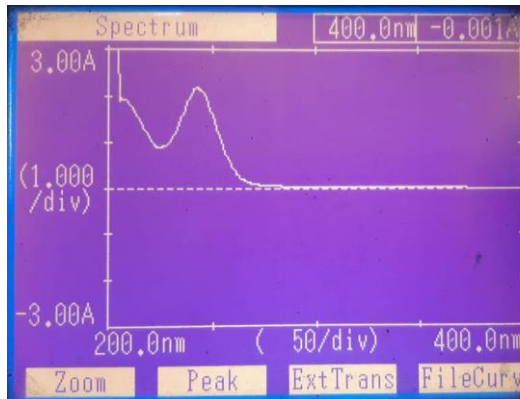
Kristal pertama kali melebur



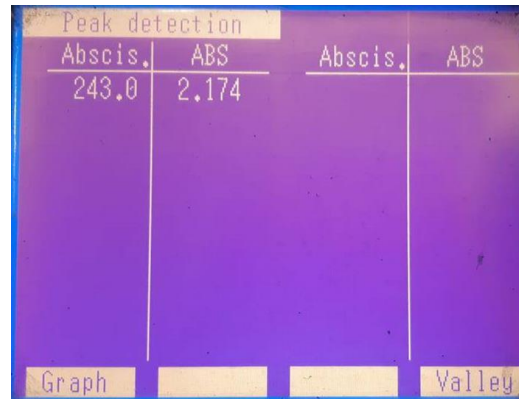
Kristal melebur seluruhnya

**b. Replikasi-2****Kristal pertama kali melebur****Kristal melebur seluruhnya****c. Replikasi-3****Kristal pertama kali melebur****Kristal melebur seluruhnya**

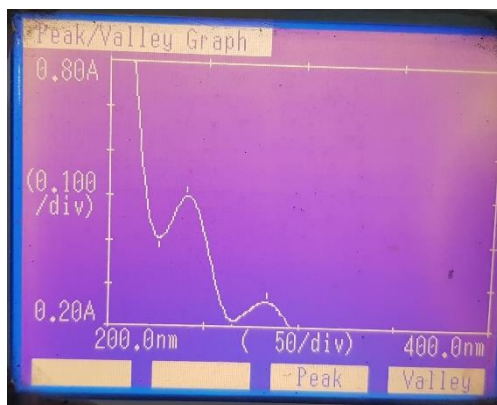
### Lampiran 6. Spektra Hasil Spektrofotometer UV



**Spektrum Alitiourea**



**Panjang gelombang Alitiourea**



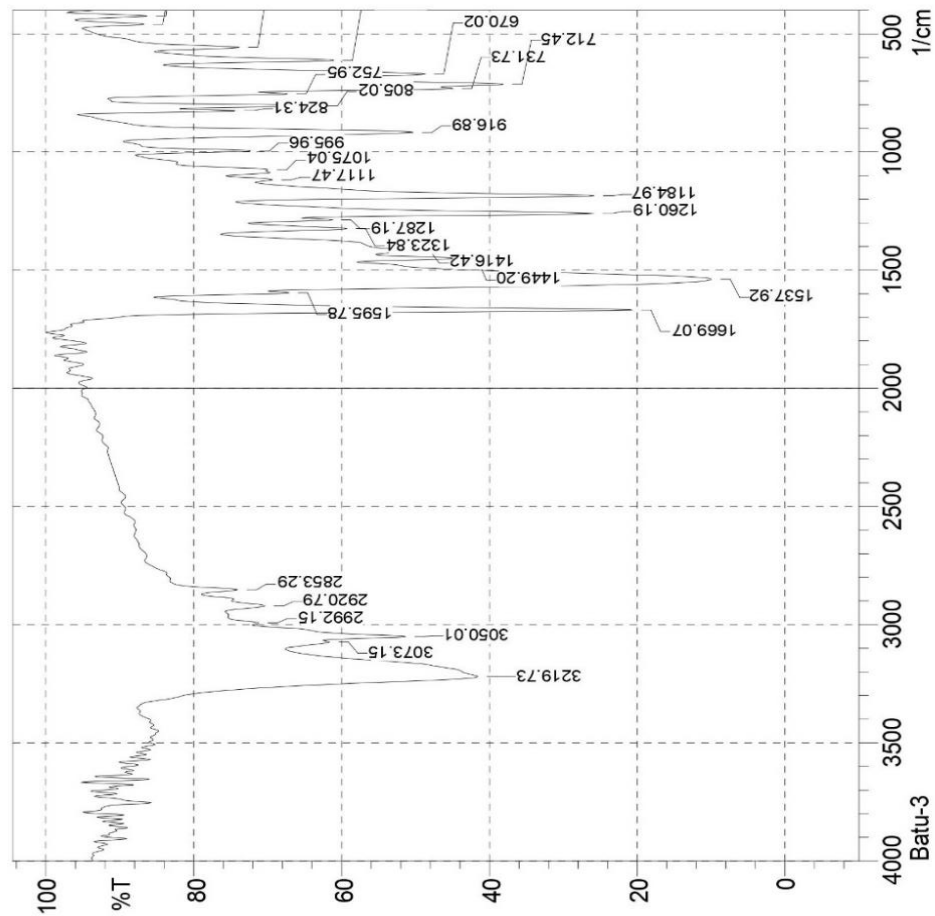
**Spektrum BATU-3**



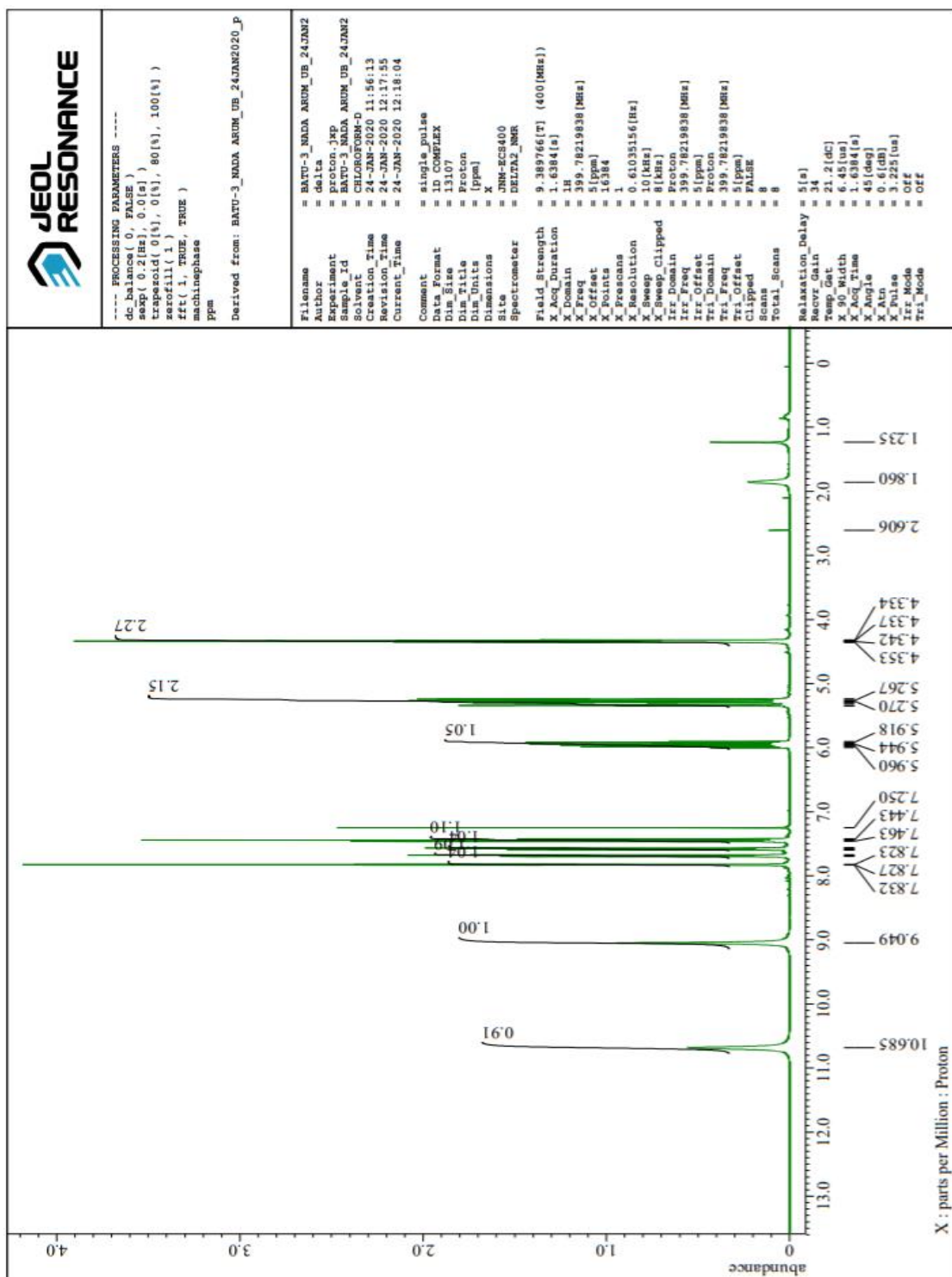
**Panjang gelombang BATU-3**

### Lampiran 7. Spektra Hasil Spektrofotometri IR

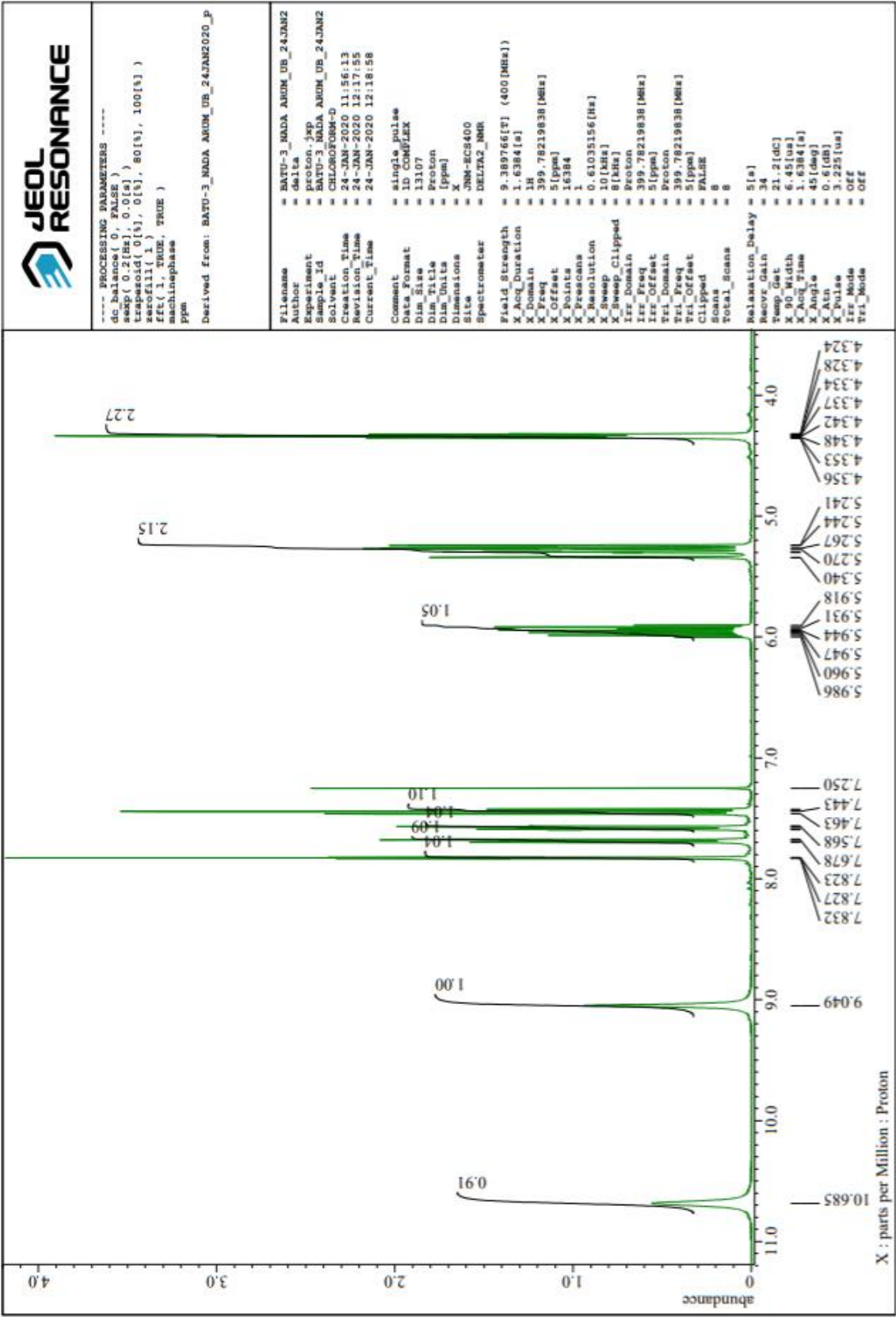
Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	400	93.464	0	409.64	400	0.19
2	425.07	86.321	10.268	440.5	409.64	1.188
3	459.79	86.772	8.784	477.15	440.5	1.376
4	556.22	73.883	13.161	573.58	477.15	5.793
5	612.16	61.116	23.253	629.51	573.58	6.907
6	670.02	48.739	19.313	691.23	629.51	11.982
7	712.45	38.156	13.081	724.02	691.23	10.231
8	731.73	44.972	8.843	745.23	724.02	5.509
9	752.95	67.35	8.202	774.16	745.23	2.929
10	805.02	63.114	21.418	816.6	774.16	4.093
11	824.31	74.435	11.693	841.67	816.6	2.053
12	916.89	50.373	41.111	953.53	841.67	12.32
13	995.96	72.37	15.839	1011.39	953.53	4.52
14	1075.04	69.99	1.875	1078.9	1011.39	3.48
15	1117.47	69.369	3.877	1129.04	1078.9	4.182
16	1184.97	25.865	47.565	1210.05	1129.04	22.654
17	1260.19	25.9	41.521	1277.55	1210.05	19.205
18	1287.19	61.283	6.689	1300.7	1277.55	3.955
19	1323.84	59.327	15.013	1346.98	1300.7	7.719
20	1416.42	50.627	9.025	1433.77	1346.98	19.207
21	1449.2	44.274	12.105	1464.63	1433.77	8.722
22	1537.92	10	54.931	1588.07	1464.63	42.5
23	1595.78	67.155	7.165	1615.07	1588.07	3.5
24	1669.07	20.714	69.94	1713.43	1615.07	19.551
25	2853.29	74.052	6.323	2872.57	1713.43	5.895
26	2920.79	70.409	4.884	2943.93	2872.57	6.095
27	2992.15	71.238	1.59	2999.86	2943.93	4.155
28	3050.01	51.349	13.418	3065.44	2999.86	13.437
29	3073.15	61.668	1.67	3102.09	3065.44	6.706
30	3219.73	41.585	35.392	3350.89	3102.09	52.585



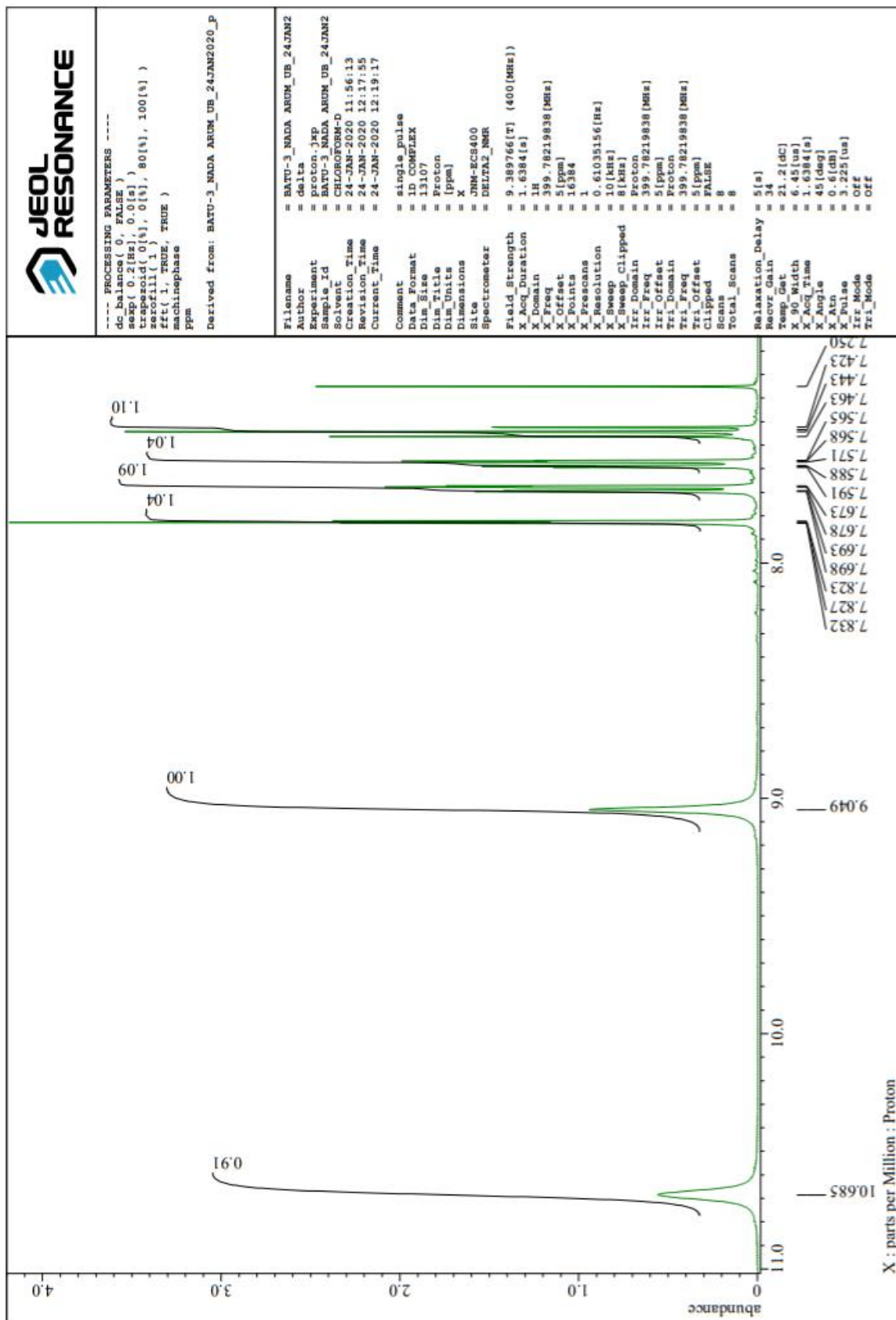
### Lampiran 8. Spektra Hasil Spektrofotometri <sup>1</sup>H-NMR

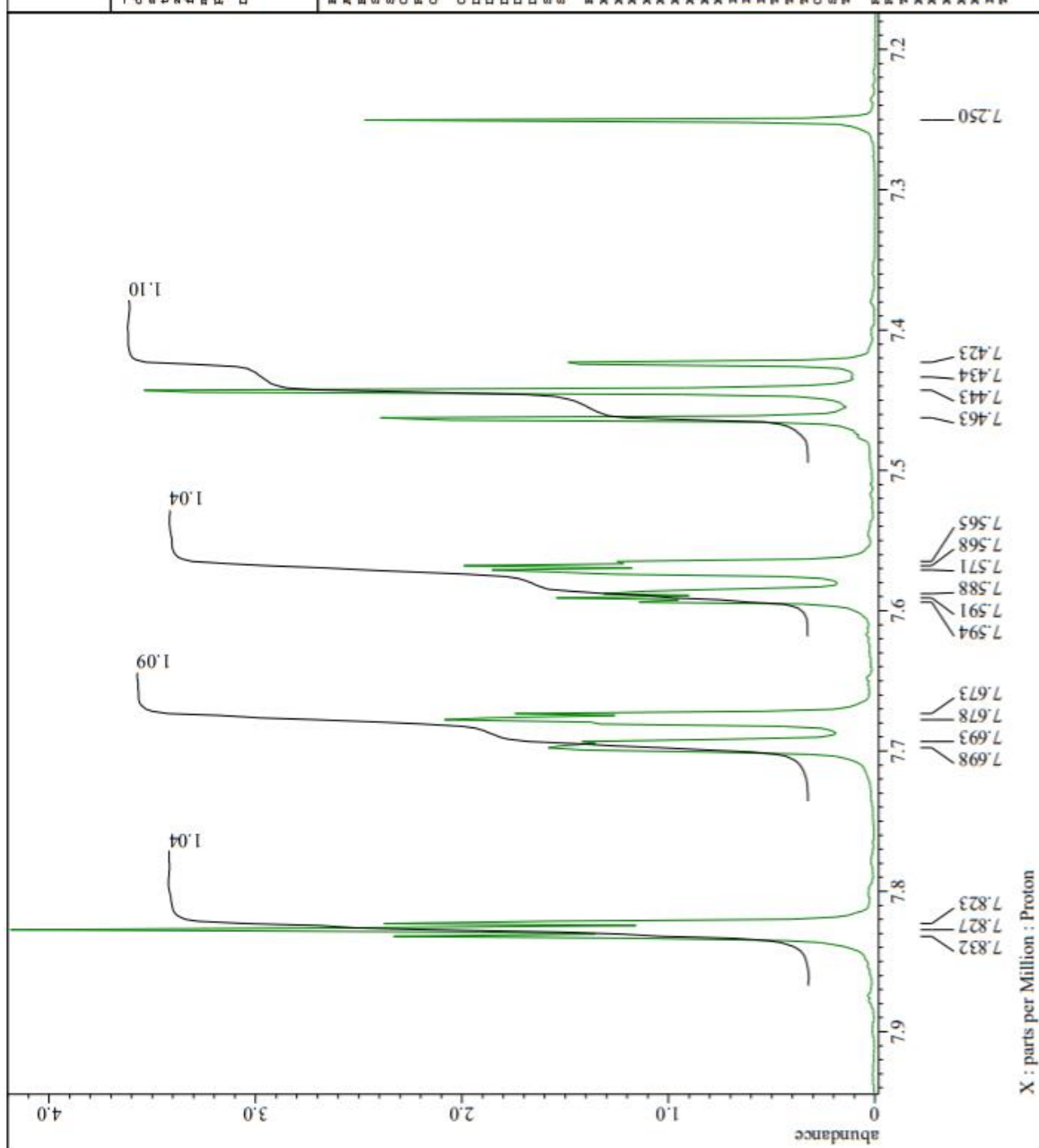












X : parts per Million : Proton

----- PROCESSING PARAMETERS -----

```
dc_balance( 0, FALSE )
temp( 0.2[Hz], 0.0[a] )
trapezoid( 0[a], 0[a], 80[a], 100[a] )
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
```

wide

Derived from: BATU-3 NADA ARUM UB 24JAN2020\_P

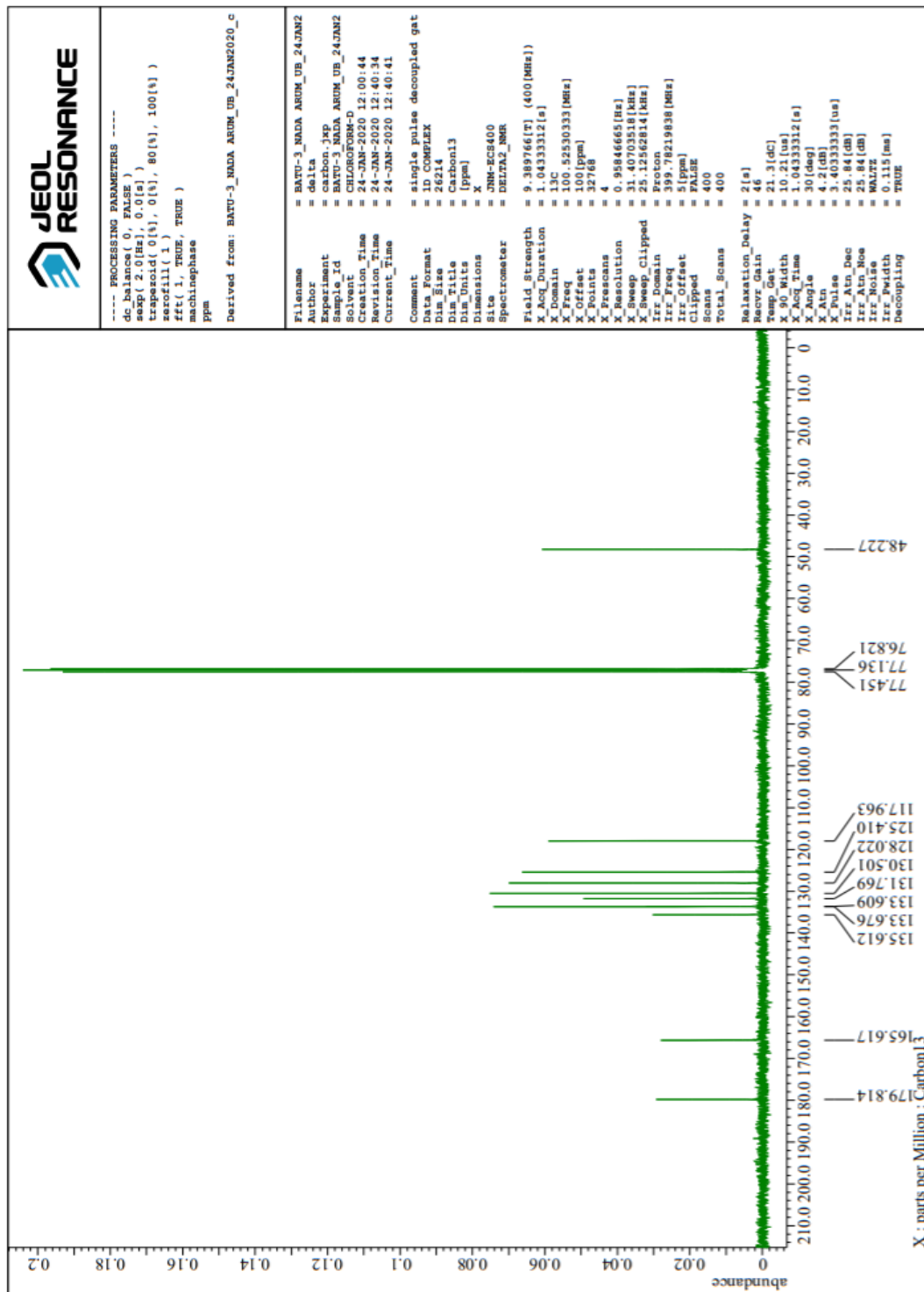
```

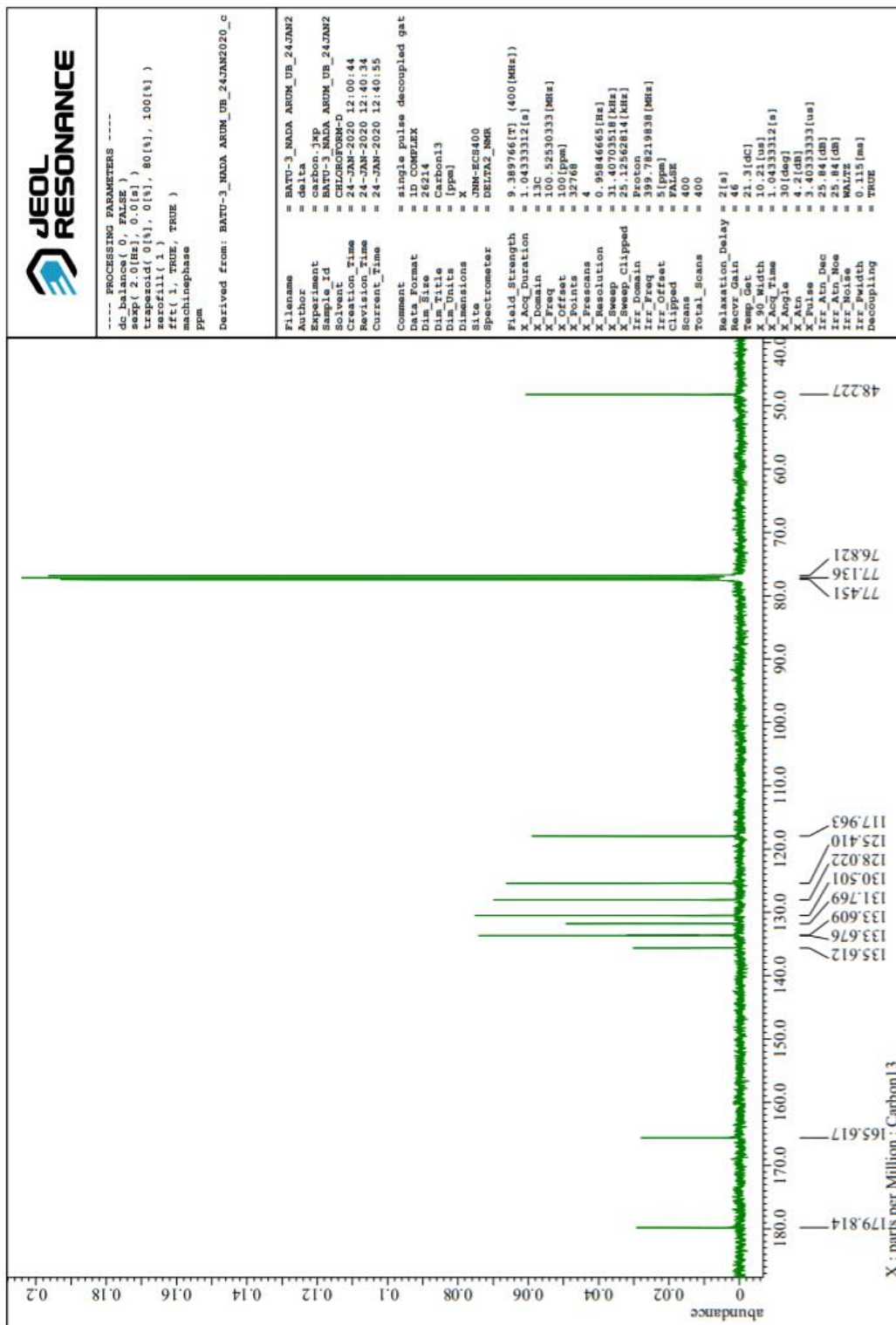
= BATU-3_NADA_ARUM_UB_24JAN2
= data
= proton_jmp
= sample_id
= CHLOROFORM-D
= BATU-3_NADA_ARUM_UB_24JAN2
= 24-JAN-2020 11:56:13
= 24-JAN-2020 12:17:55
= 24-JAN-2020 12:19:31
= single_pulse
= ID_COMPLEX
= 13107
= Proton
= [ppm]
= X
= JNM-EC8400
= DELTA1_WNR
= 9.389766[T] (400[MHz])
= 1.6384[s]
= 1H
= 399.78219838[MHz]
= 5[ppm]
= 16384
= Prescans
= 0.61035156[Hz]
= 10[kHz]
= 8[kHz]
= Proton
= 399.78219838[MHz]
= 5[ppm]
= Proton
= 399.78219838[MHz]
= 5[ppm]
= FALSE
= 8
= 8
= Relaxation_Delay = 5[s]
= 34
= Acqvr Gain
= 21.2[dc]
= Temp Get
= 6.45[us]
= 1.6384[s]
= 45[deg]
= 0.6[db]
= 3.225[us]
= Off
= Off
= Off

```



# Lampiran 9. Spektra Hasil Spektrofotometri $^{13}\text{C}$ -NMR

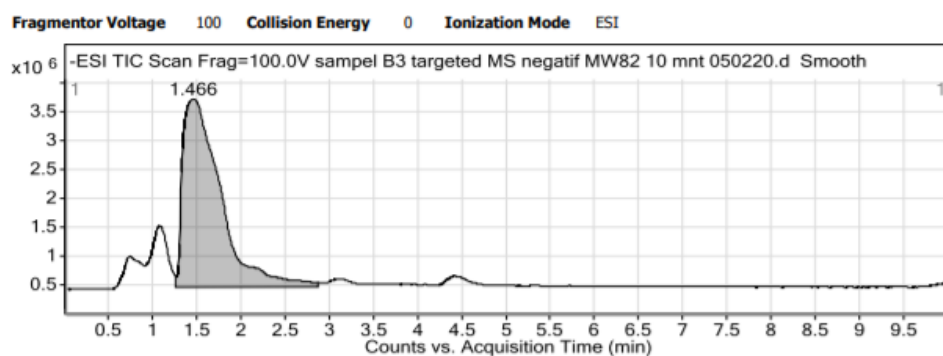






## Lampiran 10. Spektra Hasil Spektrometri Massa

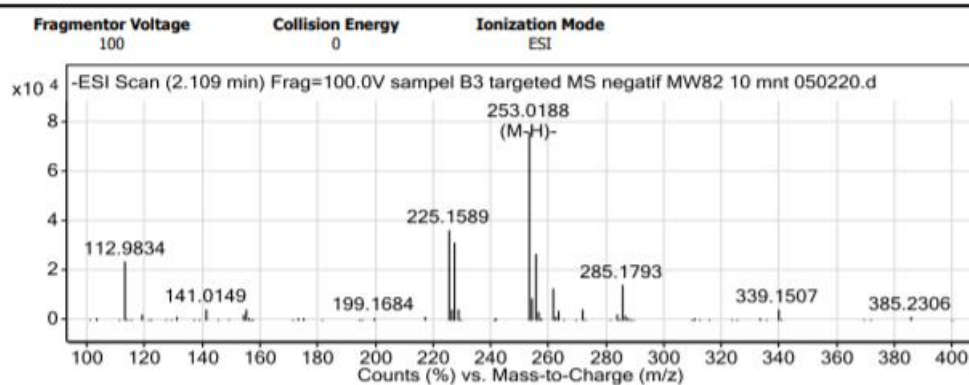
### User Chromatograms



### Integration Peak List

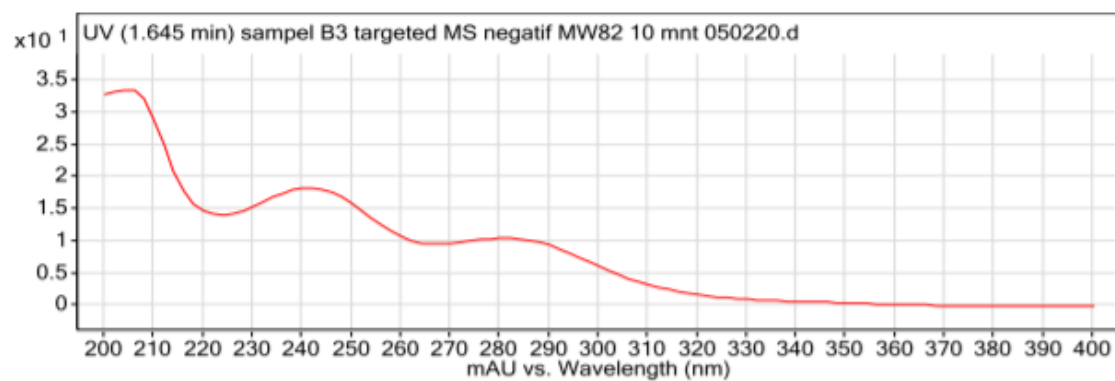
Start	RT	End	Height	Area	Area %
1.267	1.466	2.877	3273660.63	98856364.92	100

### User Spectra



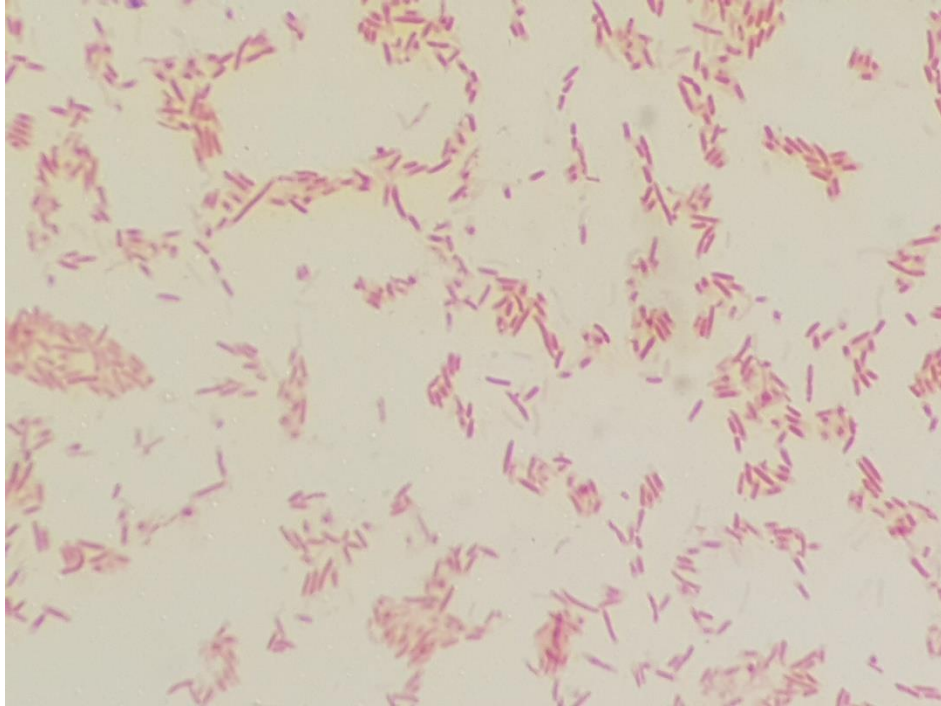
### Peak List

m/z	z	Abund	Formula	Ion
112.9834	1	51579.25		
225.1589	1	79213.8		
227.1997	1	68401.85		
228.2025	1	10514.26		
253.0188	1	164287.23	C14 H6 Cl N2 O	(M-H)-
254.0209	1	19536.87	C14 H6 Cl N2 O	(M-H)-
255.0157	1	58520.07	C14 H6 Cl N2 O	(M-H)-
255.2304	1	18127.18		
261.135	1	28170.93		
285.1793	1	31128.53		



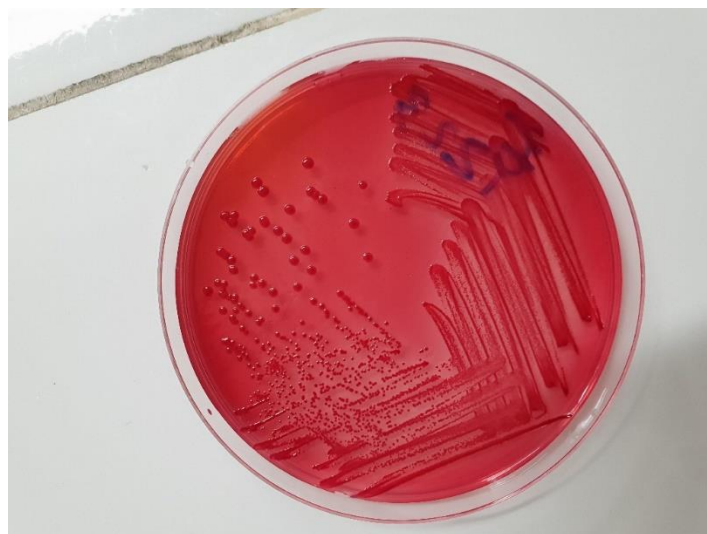
## Lampiran 11. Hasil Uji Identifikasi Bakteri

### 1. Uji Pewarnaan Gram



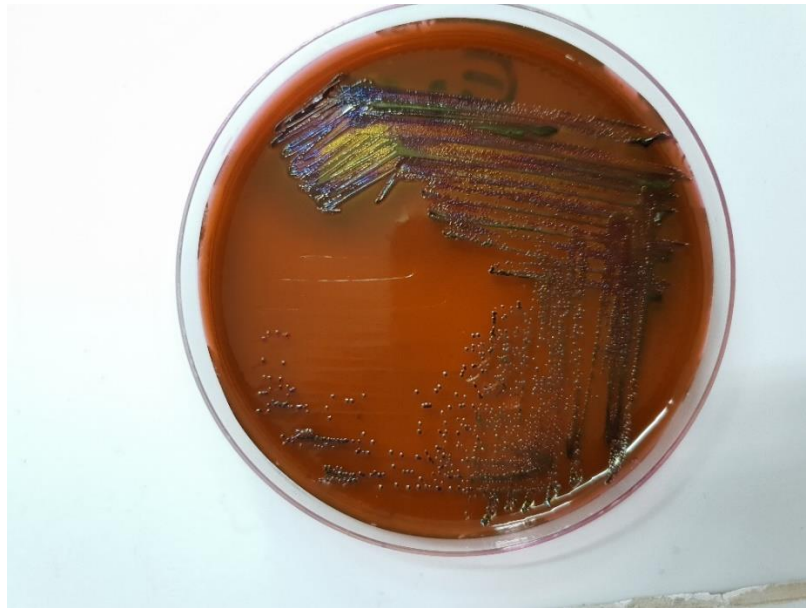
Mikroskop dengan perbesaran 1000x

### 2. Kultur pada Media *MacConkey Agar* (MCA)





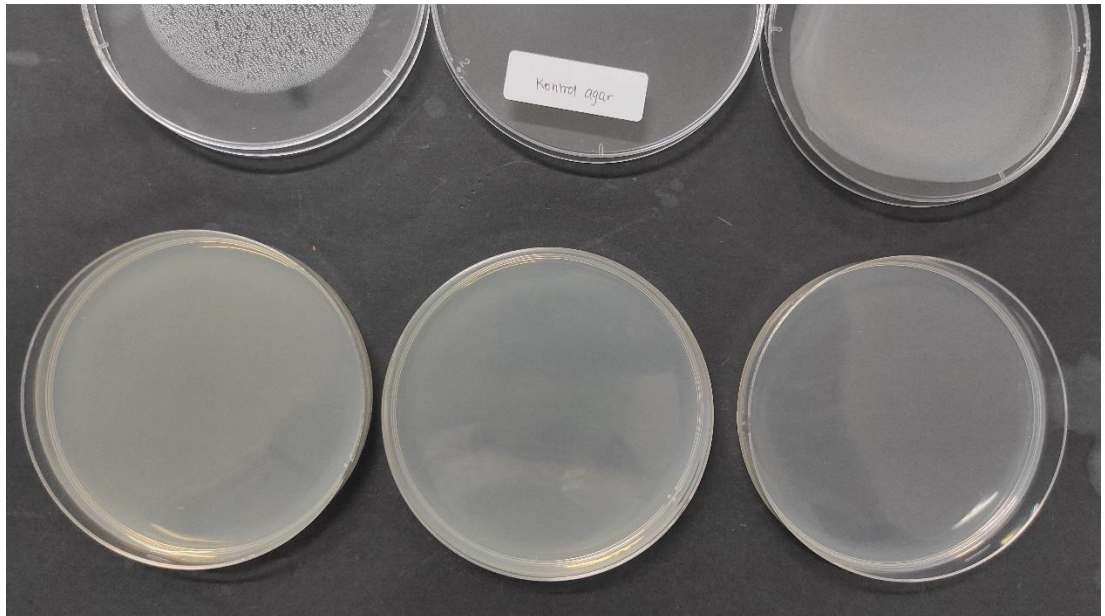
### 3. Kultur pada Media *Eosin Methylene Blue* (EMB)



**Lampiran 12. Hasil Uji Aktivitas Anttibakteri dengan Metode Dilusi Agar**

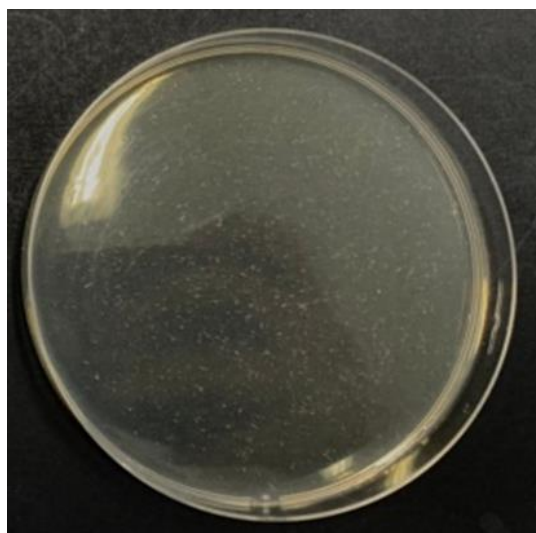
**1. Kontrol Agar**

**(Media MHA)**



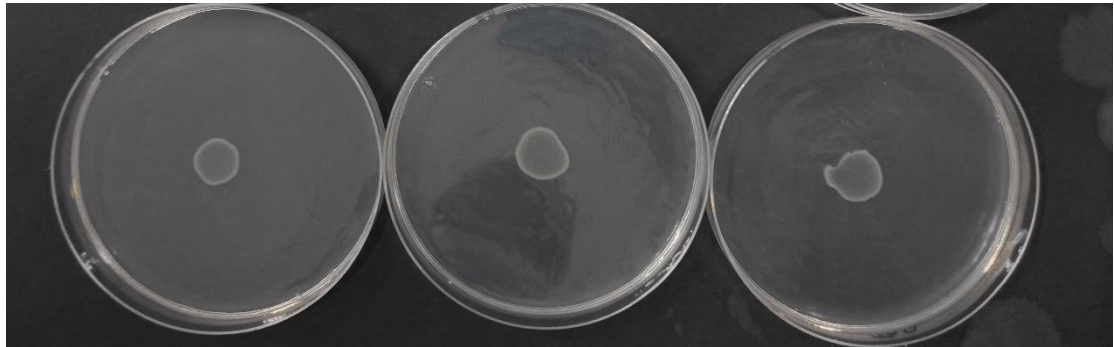
**2. Kontrol BATU-3**

**(Media MHA + Senyawa BATU-3)**



### 3. Kontrol Bakteri

(Media MHA + Pelarut Tween 80 0,4% + Bakteri *Escherichia coli*)



R1

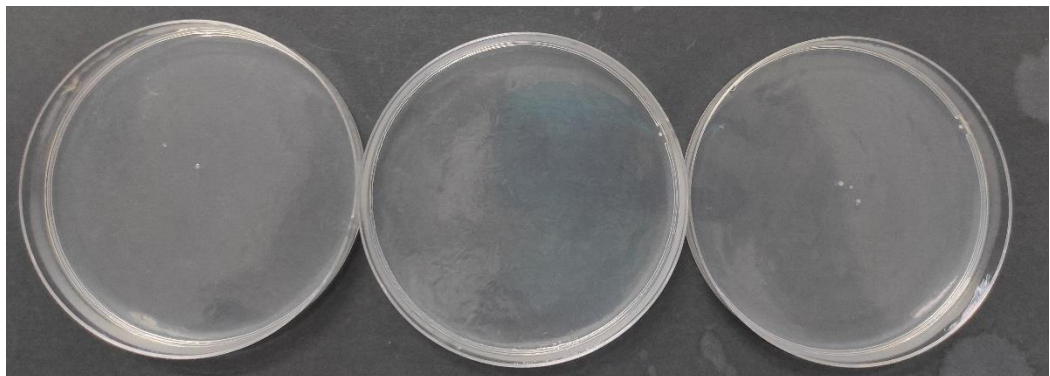
R2

R3

### 4. Senyawa Pembanding

(Media MHA + Gentamisin + Bakteri *Escherichia coli*)

#### a. Konsentrasi 1 ppm

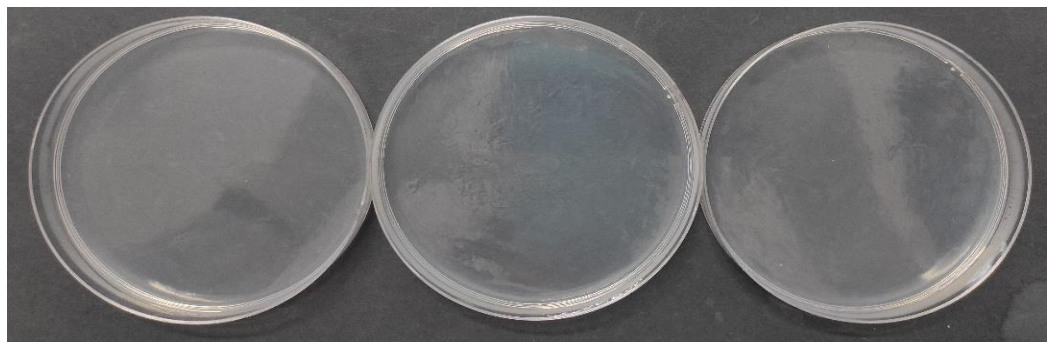


R1

R2

R3

#### b. Konsentrasi 2 ppm

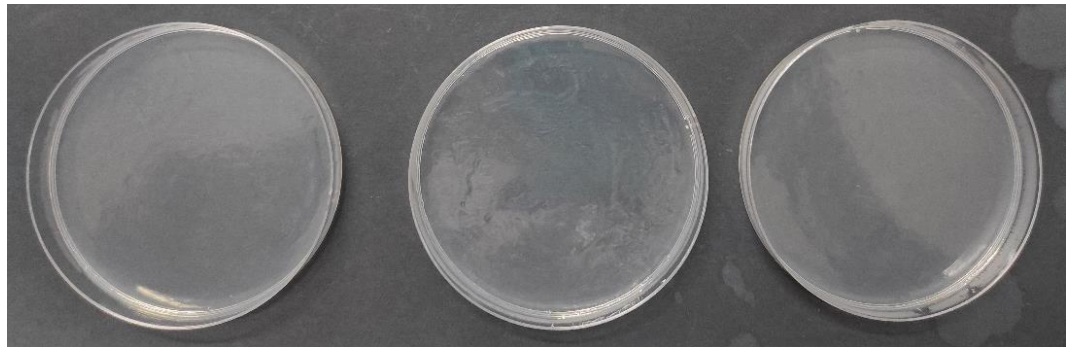


R1

R2

R3

**c. Konsentrasi 4 ppm**

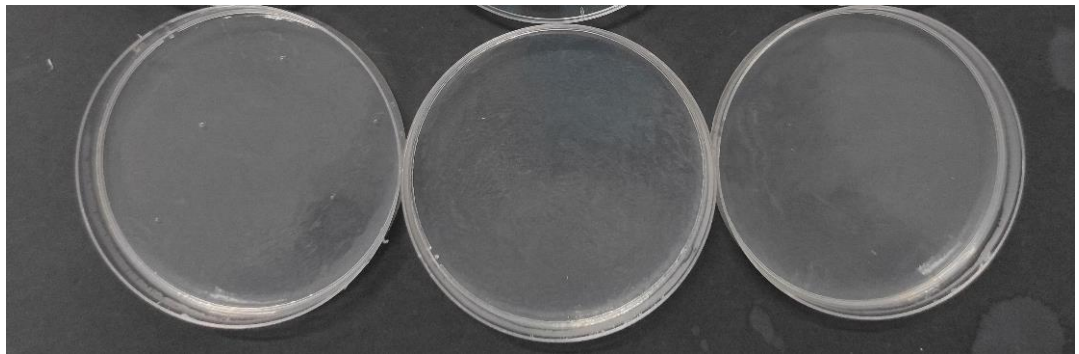


**R1**

**R2**

**R3**

**d. Konsentrasi 8 ppm**

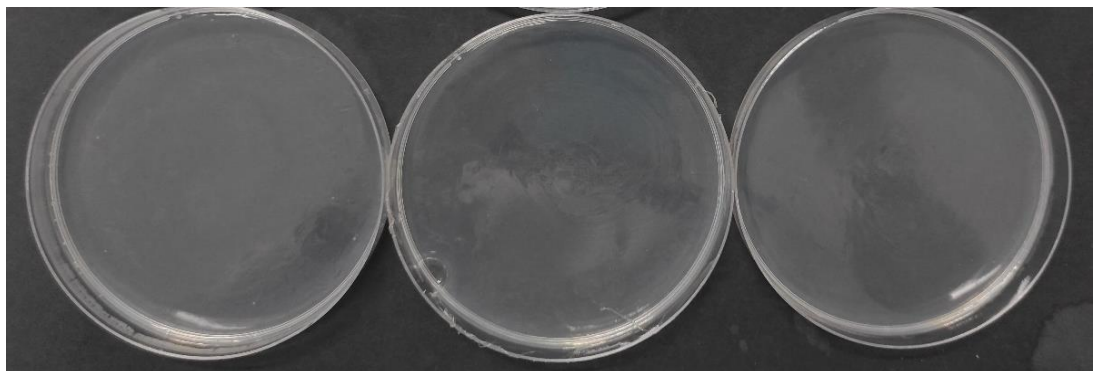


**R1**

**R2**

**R3**

**e. Konsentrasi 16 ppm**



**R1**

**R2**

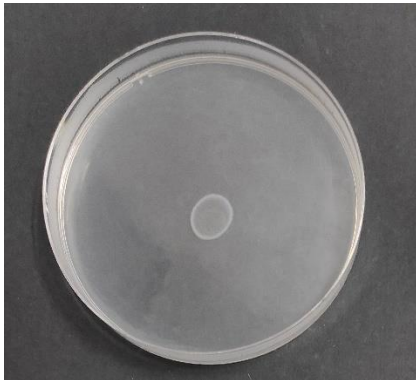
**R3**



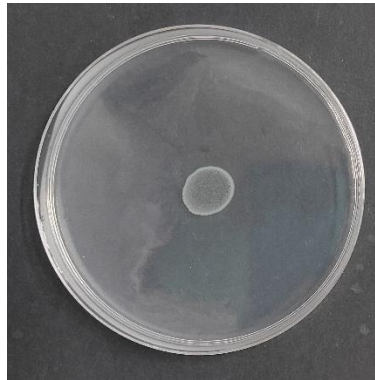
**5. Senyawa Sampel Uji**  
**(Media MHA + Senyawa BATU-3 + Bakteri *Escherichia coli*)**

**a. Konsentrasi 7,8125 ppm**

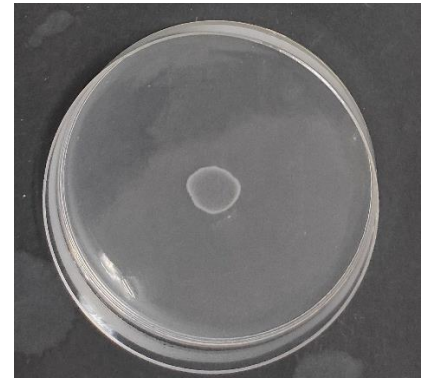
**R1**



**R2**

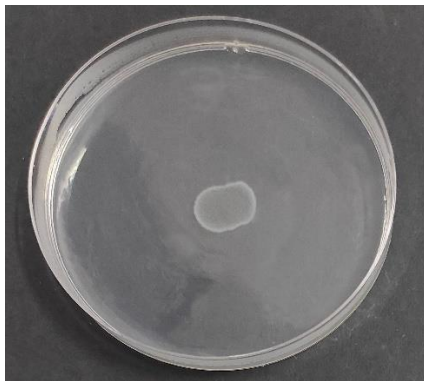


**R3**

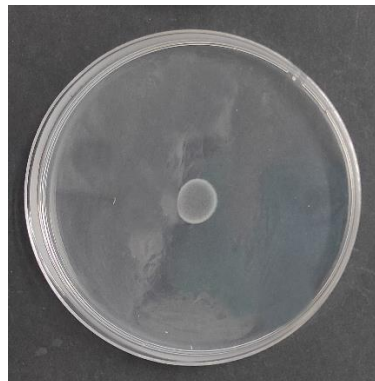


**b. Konsentrasi 15,625 ppm**

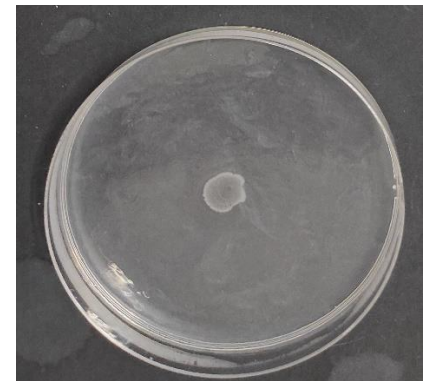
**R1**

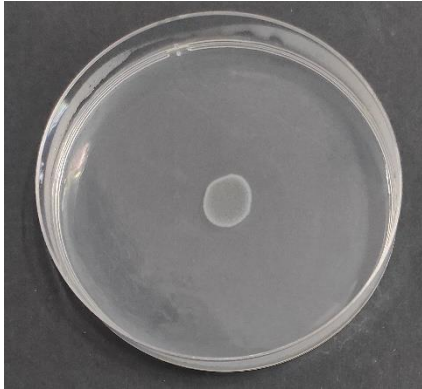
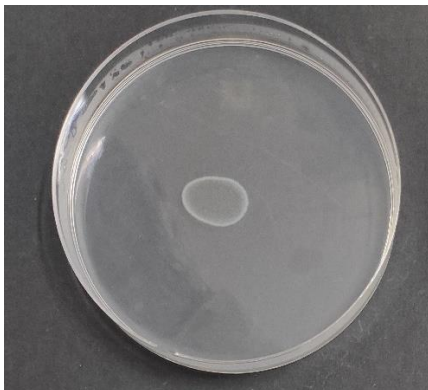
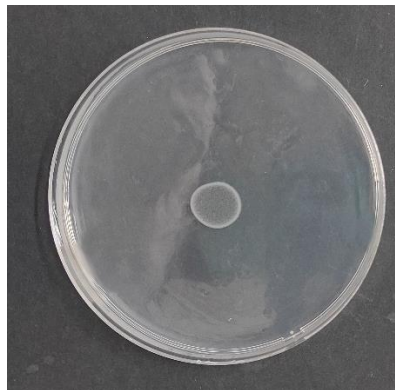
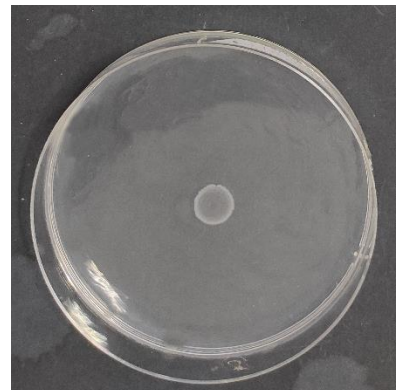


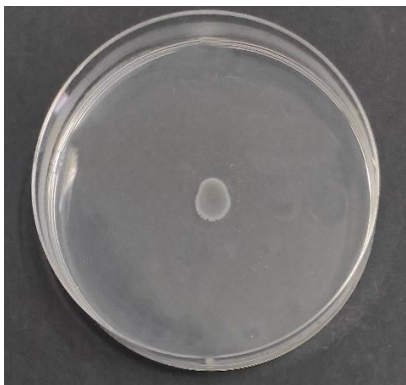
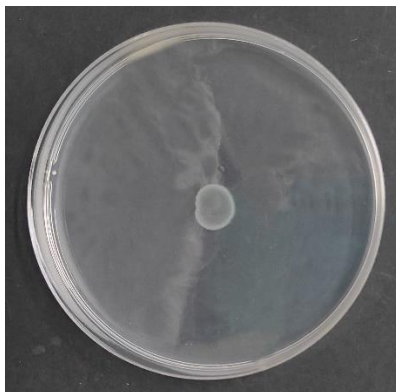
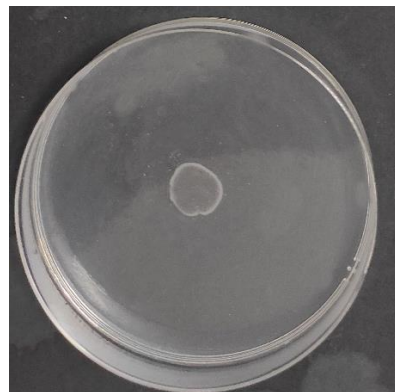
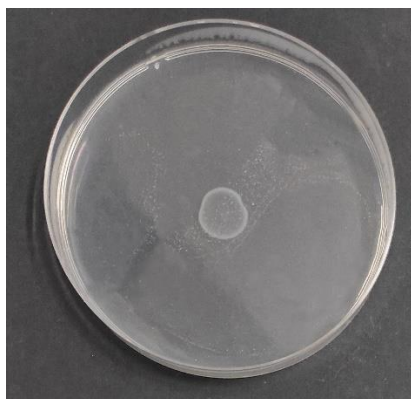
**R2**

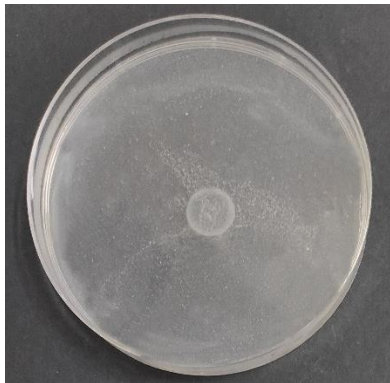
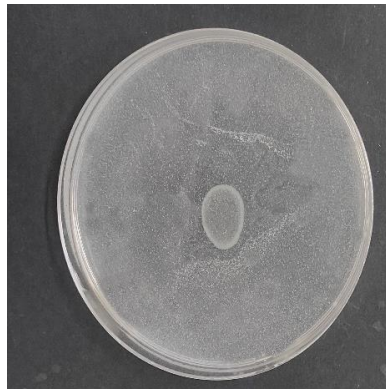


**R3**



**c. Konsentrasi 31,25 ppm****R1****R2****R3****d. Konsentrasi 62,5 ppm****R1****R2****R3**

**e. Konsentrasi 125 ppm****R1****R2****R3****f. Konsentrasi 250 ppm****R1****R2****R3**

**g. Konsentrasi 500 ppm****R1****R2****R3****h. Konsentrasi 1000 ppm****R1****R2****R3**